



Aspectos do processo de seleção sexual em *Nerophis lumbriciformis*, uma marinha com reversão dos papéis sexuais

Bernardo Miranda Pinto Barbosa

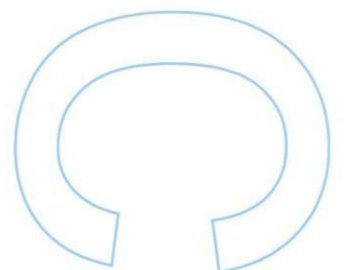
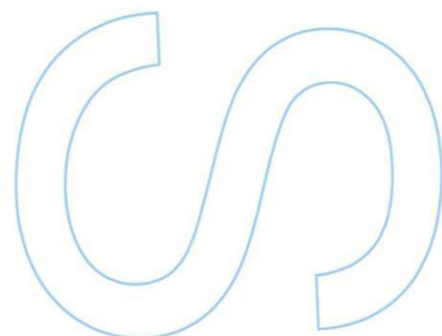
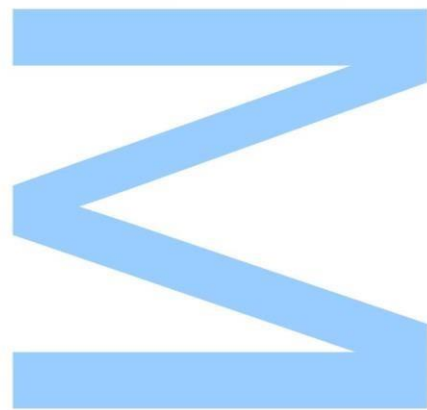
Biologia e Gestão da Qualidade da Água

Departamento de Biologia

2016

Orientador

Professor Doutor Nuno Miguel Monteiro, Investigador auxiliar, CIBIO, FCUP
e Professor auxiliar, UFP

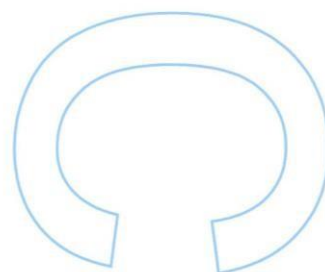
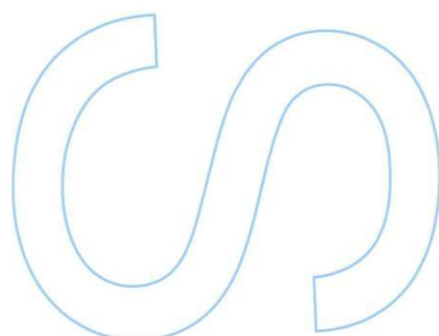
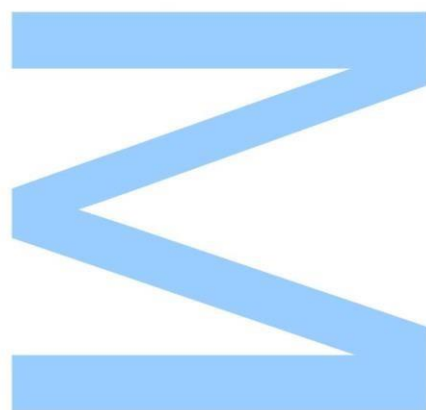




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de alguma maneira, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Professor e orientador Nuno Miguel Monteiro, agradeço do fundo do coração a ajuda que me deu, tanto na sugestão do tema, como na confiança demonstrada, na paciência e pela dedicação e ensinamentos transmitidos.

Agradeço também ao Mário Cunha pelos esclarecimentos tanto na parte prática como teórica, e pela sua amizade.

Um agradecimento à Professora Natividade Vieira pela ajuda e a total disponibilidade transmitida.

Também estou agradecido à Daniela Figueiredo, por estar sempre ao meu lado, mesmo nas alturas em que me apetecia estar só e quando não era boa companhia para ninguém.

À minha família, pelo apoio incondicional, pela paciência e confiança em todos os momentos.

Resumo

A seleção sexual é uma potente força evolutiva que contribui para o surgimento e manutenção de características que aumentam o sucesso reprodutivo dos indivíduos, através de mecanismos de escolha do parceiro ou de competição intrasexual. Estudos sobre o sistema de acasalamento de *Nerophis lumbriciformis*, em Viana do Castelo (uma das populações mais próximas do limite sul de distribuição da espécie) mostram que determinadas características morfológicas, como o tamanho e a coloração, influenciam o sucesso reprodutivo das fêmeas. Neste trabalho foi selecionado como modelo experimental a marinha *Nerophis lumbriciformis*, que pertence à família *Syngnathidae*, pois esta espécie apresenta uma fascinante série de adaptações relacionadas com a reprodução, nomeadamente a gravidez masculina e uma marcada inversão dos papéis sexuais com expressão de caracteres sexuais secundários em fêmeas. O presente estudo teve como principal objetivo avaliar, durante o processo de seleção sexual pré-cópula, a natureza plástica da coloração em fêmeas, uma vez que este carácter sexual secundário tende a indicar diferenças individuais de qualidade. Os resultados obtidos mostraram uma inesperada sincronia na coloração e no peso entre pares de fêmeas. Esta observação, de que a variação da expressão de caracteres sexuais secundários pode ser rapidamente influenciada pelo contexto social pode abrir um novo campo de investigação relacionado com a teoria da seleção sexual, uma vez que permite questionar a ideia prevalente da honestidade intrínseca dos sinais sexuais. Foi ainda possível verificar, numa espécie de syngnatídeo com uma superfície incubadora simples, que a transferência de nutrientes entre o pai e a prole não será impossível. Mais ainda, verificou-se que o tempo de gravidez e tamanho à nascença dos juvenis é diretamente influenciado pela temperatura.

Palavras-chave: Seleção sexual; *Syngnathidae*; *Nerophis lumbriciformis*; Caracteres sexuais; Fêmeas; Sincronia.

Abstract

Sexual selection is a powerful evolutionary force that contributes to the generation and maintenance of characters that increase individual reproductive success, through mate choice or intra-sexual competition. Studies on the *Nerophis lumbriciformis* reproducing system, in Viana do Castelo (one of the populations closest to the species southern distribution limit) show that certain morphological characteristic, such as size and coloration, influence the reproductive success of females. In this work, the pipefish *Nerophis lumbriciformis*, a member of the family *Syngnathidae*, was selected as an experimental model, due to the presence of a wide array of adaptations related to reproduction, such as male pregnancy and a marked reversal of gender roles, with secondary sexual character expression in females. The study aimed at evaluating the plastic nature of coloration in females during pre-mating because this secondary sexual character indicates individual differences in quality. The results showed an unexpected synchronization in the coloration and in the weight between pairs of competing females. As the adjustment of secondary sexual character expression seems to be quickly modulated by social context, one can inquiry the prevalent notion of sexual signal honesty. It was also possible to see, in a pipefish with a simple brooding surface, that the transfer of nutrients between the father and the offspring is possible. Finally, this study also showed that pregnancy length and the size at birth is directly influenced by water temperature.

Key words: Sexual selection; *Syngnathidae*; *Nerophis lumbriciformis*; Sexual characters; Females; Synchronization

Índice

1.Introdução.....	9
1.1. Seleção sexual	9
1.2. Syngnatídeos	12
1.2.1. Espécie em estudo - <i>Nerophis lumbriciformis</i>	16
1.3. Objetivos	18
1.3.1. Objetivos Gerais	18
1.3.2. Objetivos Específicos.....	18
2.Procedimento experimental	20
2.1. Local de estudo e metodologia na captura dos indivíduos.....	20
2.2. Manutenção da espécie em laboratório	21
2.3. Material e Métodos.....	21
2.4. Caracterização sumária da amostra em estudo.....	27
2.5. Análise de parentesco	27
2.5.1. Extração do ADN	27
2.5.2 Seleção de microssatélites e amplificação por reações em cadeia da Polimerase (PCR).....	28
2.5.3 Genotipagem dos produtos de PCR.....	29
3. Resultados e Discussão.....	30
3.1. Correlações iniciais e sucesso reprodutivo.....	30
3.2. Coloração.....	32
3.2.1. Será que fêmeas maiores e mais coloridas podem transferir melhores oócitos para os machos?	32
3.3 Ovos e oócitos.....	35
3.3.1. Serão as fêmeas capazes de minimizar, no seu potencial reprodutivo, o impacto negativo de uma perda de oócitos?	35
3.4. Sincronia	39
3.4.1. Poderão as fêmeas influenciar-se mutuamente na expressão de caracteres sexuais secundários?	39
3.5. Pai.....	42
3.5.1. Será que, no género <i>Nerophis</i> , pode existir transferência de nutrientes entre o pai e a sua prole?	42
3.6. Temperatura.....	45
3.6.1. O tamanho dos recém-nascidos e tempo de gravidez é influenciado pela temperatura?	45
4.Conclusão.....	48
5.Referências Bibliográficas	49

Lista de Figuras

Figura 1. Evolução da estrutura de incubação em machos da família Syngnathidae. Superfície incubadora em <i>Nerophis lumbriciformis</i> e bolsa incubadora em Hippocampus (modificado de Stolting & Wilson 2007).....	14
Figura 2. Distribuição biogeográfica de <i>Nerophis lumbriciformis</i> , de acordo com Dawson (1986). Imagem de Monteiro & Lyons (2012).	16
Figura 3. Mapa de Portugal (A) e local de amostragem (B) na Praia do Forte da Vígia, em Viana do Castelo (fonte: Google Earth).....	20
Figura 4. A1- Imagem da face direita de uma fêmea de <i>Nerophis lumbriciformis</i> . A2- Imagem monocromática de toda a área da face direita da fêmea da imagem A1, manipulada no programa Gimp. A3- Imagem monocromática das manchas da face direita da fêmea da imagem A1, manipulada no programa Gimp.....	22
Figura 5. A- Fotografia de corpo inteiro de uma marinha da espécie <i>Nerophis lumbriciformis</i> . B. Fotografia da face esquerda de uma fêmea.....	23
Figura 6. Fotografia da zona incubadora de um macho grávido de <i>Nerophis lumbriciformis</i>	24
Figura 7. A- Fotografia de uma postura perdida de uma fêmea. B- Fotografia de um oócito isolado de <i>Nerophis lumbriciformis</i>	25
Figura 8. Fotografia de um recém-nascido de <i>Nerophis lumbriciformis</i>	25
Figura 9. Relação entre o peso do oócito e peso húmido da postura e alterações de coloração das fêmeas de <i>Nerophis lumbriciformis</i> aquando da perda de uma postura.	33
Figura 10. Relação entre o tamanho médio do oócito e as perdas de peso das fêmeas de <i>Nerophis lumbriciformis</i> aquando da perda de posturas.....	34
Figura 11. Relação do tamanho dos oócitos e o seu peso ou tamanho das fêmeas de <i>Nerophis lumbriciformis</i>	34
Figura 12. Número de oócitos libertados por fêmeas de <i>Nerophis lumbriciformis</i> em duas posturas perdidas (a-primeira postura perdida; b-segunda postura perdida).	36
Figura 13. Número de ovos colocados por fêmeas de <i>Nerophis lumbriciformis</i> em duas gravidezes (a-primeira gravidez; b-segunda gravidez).....	37
Figura 14. Comparação entre o número total de oócitos perdidos e o número total de ovos em <i>Nerophis lumbriciformis</i>	38
Figura 15. Relação entre o peso e a coloração da fêmea que engravidou o macho e a coloração e peso da outra fêmea (diferença de peso no momento da gravidez do macho e o momento anterior à gravidez).	40

Figura 16. Relação entre a coloração e peso da fêmea que perdeu a postura e a coloração e peso da outra fêmea (diferença de coloração no momento da perda da postura e o momento anterior à perda da postura).	40
Figura 18. Relação entre a perda de peso do macho de <i>Nerophis lumbriciformis</i> e média do peso individual dos ovos e peso da prole.....	43
Figura 17. Relação entre a perda de peso do macho de <i>Nerophis lumbriciformis</i> e o número de ovos.	43
Figura 19. Relação entre o peso médio individual dos ovos e o peso da postura do macho.....	44
Figura 20. Relação entre o número de ovos que o macho recebeu e o peso total da postura.....	44
Figura 21. Relação entre o tempo de gestação dos machos e a temperatura da água a que ocorreu a gravidez.	46
Figura 22. Relação da média dos tamanhos dos embriões com a temperatura a que ocorreu a gravidez	47

1.Introdução

1.1. Seleção sexual

A seleção sexual é uma potente força evolutiva que contribui para o surgimento e manutenção de características que aumentam o sucesso reprodutivo dos indivíduos, através de mecanismos de escolha do parceiro ou de competição intrasexual (Darwin, 1871). Estas características, como os ornamentos (ex: a cauda do pavão) ou exibições elaboradas (ex: danças nupciais das aves do paraíso), não trazem necessariamente vantagens em termos de sobrevivência, mas conferem vantagens reprodutivas. Estes caracteres sexuais secundários estão ligados a mecanismos de competição intrasexual, ao contrário dos caracteres sexuais primários que estão ligados diretamente ao ato da reprodução (Darwin, 1871).

A seleção sexual pode resultar da diferença na taxa potencial reprodutiva (TPR), número potencial de descendentes produzidos por unidade de tempo entre os sexos (Clutton-Brock & Parker, 1992). Machos e fêmeas diferem, por definição, na qualidade e quantidade de gametas produzidos (anisogamia): os machos produzem gametas pequenos e numerosos enquanto as fêmeas produzem gametas maiores e em menor número (Trivers, 1972). A anisogamia potencia TPR maiores em machos e menores em fêmeas e, sendo assim, os machos devem maximizar o seu sucesso reprodutivo com o aumento no número de fertilizações, enquanto que as fêmeas dependem da viabilidade dos seus gametas (Bateman, 1948). Diferenças na TPR entre os sexos resultam habitualmente num maior número de machos sexualmente ativos em relação ao número de fêmeas ativas, num determinado espaço de tempo (razão sexual operacional, RSO; Emlen & Oring, 1977; Clutton-Brock & Parker, 1992). Consequentemente, geralmente ocorre um aumento na competição entre machos pela conquista de fêmeas que, por sua vez, tendem a ser seletivas na escolha de parceiros de melhor qualidade (Andersson, 1994). Outros fatores além da anisogamia também podem influenciar a RSO, como a razão sexual no nascimento (razão sexual primária) e a taxa de mortalidade diferencial entre machos e fêmeas (Clutton-Brock & Parker, 1992; Clutton-Brock, 2007). No entanto, as relações entre investimento parental, TPR e RSO podem ser ainda mais complexas e os papéis sexuais, em alguns casos, apresentam-se invertidos (Andersson, 2004; Clutton-Brock, 2009).

O processo de seleção sexual, um dos temas mais abordados em biologia evolutiva, é essencialmente visto como resultando da competição entre machos por parceiros ou oportunidades de acasalamento, sendo muitas vezes negligenciado o resultado da pressão de seleção que advém da competição entre fêmeas (Clutton-Brock, 2007). Convém, pois, salientar que o processo de seleção sexual não está confinado apenas aos machos. Na natureza, o padrão mais comum é aquele em que a competição ocorre entre machos e a escolha é maioritariamente efetuada pelas fêmeas (papéis sexuais convencionais ou ortodoxos), onde as fêmeas tradicionalmente limitam o potencial reprodutivo dos machos (Trivers, 1972; Emlen & Oring, 1977). O padrão oposto, menos comum, surge quando a competição ocorre maioritariamente entre fêmeas e o papel da escolha recai essencialmente sobre os machos (papéis sexuais invertidos), com estes a limitarem o potencial reprodutivo das fêmeas (Emlen & Oring, 1977; Berglund et al., 1989). Nesta situação, a seleção sexual irá atuar sobretudo sobre as fêmeas, exponenciando a expressão dos seus caracteres sexuais secundários, como o tamanho e ornamentação (Williams, 1975). Embora nem sempre interpretado como parte do repertório de caracteres sexuais secundários, o tamanho corporal pode desempenhar um papel importante na competição por parceiros (Ripley et al., 2006) ou funcionar como atrativo para o sexo oposto. Por exemplo, as fêmeas de leão-marinho preferem os machos maiores e mais fortes, que representam uma garantia acrescida de uma prole saudável. (sealion-world disponível em <http://www.sealion-world.com>). Em marinhas do género *Syngnathus*, as fêmeas de maior tamanho são geralmente preferidas como parceiros de acasalamento (Berglund et al., 1986; Ahnesjö, 1992) e têm recorrentemente maior sucesso na competição intrasexual (Berglund et al., 1993), o que reflete os benefícios competitivos desta característica corporal.

As fêmeas interpretam um importante papel no processo de seleção sexual, desde logo pelo processo de escolha de parceiros (espécies com papéis sexuais ortodoxos). No entanto, em espécies com inversão dos papéis sexuais, onde os machos mostram preferência pelo acasalamento com fêmeas com características particulares, processos de competição entre fêmeas para atrair parceiros sexuais contribuem para o aumento da intensidade de seleção sexual (Clutton-Brock, 2009).

O grau e complexidade dos caracteres sexuais secundários deve-se sobretudo à seleção sexual, recorrente da necessidade de anunciar múltiplos tipos de informação, acerca da qualidade do indivíduo, para potenciais parceiros ou rivais (Chen et al., 2012). Quando as fêmeas competem pela atenção dos machos, a seleção favorece a evolução de sinais que indicam a sua fecundidade, assim atraindo a atenção dos machos (Clut-

ton-Brock, 2009). A preferência dos machos por certas parceiras sexuais serve, também, para aumentar o seu sucesso reprodutivo, visto que os caracteres sexuais secundários que as fêmeas ostentam, e que os machos preferem, podem estar correlacionados com diferenças individuais de qualidade (Clutton-Brock, 2009). Em certos casos, os ornamentos das fêmeas poderão mesmo refletir mudanças temporais do seu estado reprodutivo (Clutton-Brock, 2007). Evidências da escolha de parceiros pelas fêmeas (ou seleção intersexual) são abundantes na literatura (Andersson, 1994). Esse mecanismo tem sido um dos principais enfoques no âmbito da seleção sexual devido à dificuldade entre estabelecer uma relação conspícua entre escolha e benefícios (Kokko et al., 2003; Andersson & Simmons, 2006; Kotiaho & Puurtinen, 2007). Darwin (1871) já havia proposto o argumento da “apreciação pelo belo” desconsiderando que tal escolha pudesse conferir benefícios às fêmeas, ao serem seletivas. Em contraposição, o seu contemporâneo Wallace defendia que tais atributos poderiam estar correlacionados com a força ou qualidade de um indivíduo (Prum, 2012). Atualmente, aceita-se que existam vantagens adaptativas diretas, que aumentam a aptidão das fêmeas: hipótese do benefício direto (Møller & Jennions, 2001) e da exploração sensorial (Ryan, 1998), ou vantagens adaptativas indiretas, que resultam em benefícios para a descendência: hipótese de Fisher-Zahavi (Zahavi, 1975; Eshel et al., 2000; Kokko et al., 2002) e da compatibilidade genética (Zeh, 1996).

A hipótese dos benefícios diretos postula que alguns machos provisionam benefícios materiais para as fêmeas ou para a descendência, conquistam e defendem os melhores territórios, oferecem menor risco de transmissão direta de doenças, ou ainda, reduzem os custos das fêmeas associados ao cuidado parental (Kirkpatrick & Ryan, 1991; Andersson, 1994). Desta forma, a escolha por parceiros de boa qualidade favorece diretamente a sobrevivência ou fecundidade das fêmeas (Møller & Jennions, 2001). Por outro lado, o conflito sexual (divergência de interesses reprodutivos entre machos e fêmeas) muitas vezes impõe restrições diretas às fêmeas na escolha por machos com ornamentos extravagantes, pois podem reduzir a própria longevidade ou o valor adaptativo da sua descendência feminina (considerando que apenas filhos expressam a característica sexual; Arnqvist & Nilsson, 2000; Chapman et al., 2003).

A hipótese da exploração sensorial propõe que a preferência das fêmeas pode evoluir primeiramente sob pressões da seleção natural sobre outra atividade (Enquist & Arak, 1993; Ryan, 1998), tais como a procura e exploração de recursos alimentares e a proteção contra predadores. Por consequência evoluem as exibições dos machos de maneira a se ajustarem ao comportamento das fêmeas. O mecanismo da exploração sensorial, no entanto, não exclui a possibilidade de que a preferência resulte também

noutras vantagens adaptativas para as fêmeas, como por exemplo a transferência de genes de atratividade ou qualidade da descendência. Na ausência de benefícios diretos, o aumento da aptidão das fêmeas torna-se menos evidente e, alternativamente, a preferência pode evoluir devido à qualidade da descendência.

A escolha por machos mais atraentes pode garantir a herança de genes que assegurem melhor condição corporal (“bons genes”) ou maior atratividade (filhos atraentes) para a descendência (hipótese de Fisher-Zahavi; Eshel et al., 2000; Kokko et al., 2002). Essa hipótese inclui duas ideias controversas: a de que a característica do macho possa ou não indicar a sua condição corporal. No entanto, os atributos dos machos podem sinalizar qualidade independentemente do componente adaptativo (condição corporal ou atratividade) ao qual está geneticamente correlacionado uma vez que poderão favorecer a sobrevivência ou o sucesso reprodutivo (Kokko et al., 2001). Em alguns casos, o efeito negativo da expressão de um ornamento sobre a sobrevivência pode ser compensado pelo maior sucesso reprodutivo próprio ou da sua descendência (Kokko et al., 2001).

Originalmente, Darwin (1871) sugeriu que espécies altamente polígamas, com papéis sexuais ortodoxos, tendem a ser mais sexualmente dimórficas. Especificamente, espera-se que o dimorfismo sexual seja sobretudo aparente em espécies poligínicas (um macho para várias fêmeas) devido à intrínseca necessidade de competição entre machos no acesso a fêmeas, e à resultante assimetria no sucesso reprodutivo entre machos (poucos machos reproduzem-se com muitas fêmeas). Em contraponto, em espécies com papéis sexuais invertidos, espera-se um maior dimorfismo sexual em espécies mais poliândricas (Jones & Avise, 1997).

A expressão de caracteres sexuais secundários em fêmeas, em conjunto com a presença de inversão dos papéis sexuais em algumas espécies de *Syngnathidae* (Berglund et al., 1986), converteu esta família num “modelo espelho” excecional para o estudo da seleção sexual.

1.2. Syngnatídeos

A família *Syngnathidae* tem sido foco de crescente interesse não só devido à sua biologia reprodutiva peculiar (Berglund et al., 1989; Jones et al., 1999) mas também devido ao aumento da consciência da sua vulnerabilidade devido à degradação ambiental e sobrepesca (Lourie et al., 1999). Os membros da família *Syngnathidae* são peixes

teleósteos e, dentro do conjunto de espécies associadas a esta família, incluem-se os cavalos-marinhos, marinhas e dragões marinhos. Trata-se de uma família altamente diversificada, com aproximadamente 230 espécies descritas que se distribuem por 55 géneros (Dawson, 1986). O seu nome científico (em grego “syn” significa fundido e “gnathus” significa maxilas) está relacionado com a morfologia do focinho em forma de tubo, que ocorre em todas as espécies (Wiley-Blackwell, 2011) e que é usado para sugar o alimento. A maioria destes peixes são crípticos, possuem movimentos lentos e habitam zonas costeiras, como recifes de coral, mangais e construções artificiais (Wiley-Blackwell, 2011).

Todas estas espécies, apesar de apresentarem uma morfologia muito própria e distinta dos outros peixes, exibem, ainda, formas de cuidado parental muito especializadas e, por isso, são consideradas modelos privilegiados no estudo da evolução dos cuidados parentais e das implicações intrínsecas dos papéis sexuais (Wilson et al., 2003). A principal característica distintiva desta família é a ocorrência de gravidez masculina. A gravidez define-se como o período de gestação, após fecundação do zigoto, na qual ocorre o desenvolvimento do embrião em contacto próximo com o corpo do progenitor, até à eclosão (Stölting et al., 2007). O macho fornece todo o cuidado pós-zigótico à prole, com a fêmea depositando os ovos diretamente no macho, em áreas especializadas para incubação ou, numa bolsa incubadora, que se pode localizar no abdômen ou na cauda (Kvarnemo et al., 2000; Breder & Rosen, 1966). O cuidado paterno fornecido após a fertilização é comum em peixes, mas a gravidez masculina apenas ocorre nesta família. Sabe-se hoje que ocorre troca de nutrientes entre o macho e os ovos (Ripley & Foran, 2009), existindo ainda evidências de que existe transferência de aminoácidos dos ovos para o macho (Sagebakken et al., 2009).

Nos syngnatídeos, compete às fêmeas depositar os oócitos diretamente numa área ou bolsa incubadora do macho, garantindo-lhe, assim, total confiança na paternidade dos descendentes à custa de um gasto excecional no cuidado parental, quando comparado com outros vertebrados (Herald, 1959). Em espécies de marinhas que apresentam inversão dos papéis sexuais, o desequilíbrio do potencial reprodutivo entre machos e fêmeas parece estar associado à alteração dos papéis sexuais, pois a capacidade que o macho tem para receber ovos é menor que a capacidade que a fêmea possui para os produzir (Svensson, 1988; Berglund et al., 1989; Berglund & Rosenqvist, 1990). Esta desigualdade no potencial reprodutivo determina a inversão dos papéis sexuais (Clutton-Brock & Vincent, 1991; Clutton-Brock & Parker, 1992). Em cavalos marinhos, por exemplo, o potencial reprodutivo entre machos e fêmeas é similar, o que poderá explicar a ausência de inversão dos papéis sexuais (Vincent et al., 1992)

Consoante a localização da superfície incubadora, a família *Syngnathidae* foi dividida em duas sub-famílias: *Urophori*, com a superfície incubadora localizada na cauda e *Gastrophori*, com a superfície incubadora localizada no abdômen (Herald, 1959) (Figura 1). O gradiente de complexidade da superfície incubadora foi inicialmente usado na construção da primeira filogenia da família (Herald, 1959), e largamente confirmado, mais recentemente, por evidência molecular (Wilson et al., 2001). A estreita ligação entre a especiação e a especialização da bolsa incubadora identifica-a como uma inovação evolutiva chave (Wilson et al., 2001).

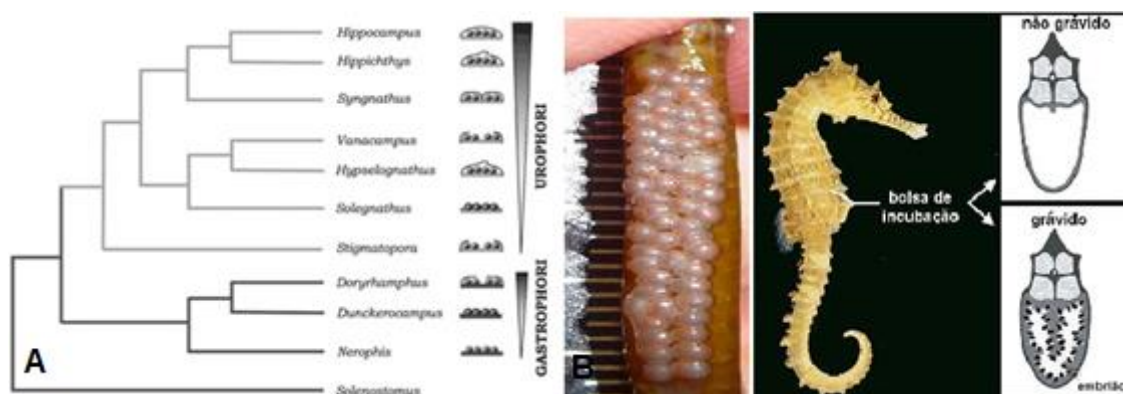


Figura 1. A- Evolução da estrutura de incubação em machos da família *Syngnathidae*. B- Superfície incubadora em *Nerophis lumbriciformis* e bolsa incubadora em *Hippocampus*. (modificado de Stolting & Wilson 2007).

Cada tipo de superfície incubadora tem diferentes características que sugerem diferentes graus de relação entre o pai e o embrião em desenvolvimento. Regra geral, estas características são inversas ao grau de exposição do ovo e diretamente proporcionais à complexidade e especialização das estruturas reprodutoras (Carpucino et al., 2002). A estrutura de incubação varia desde uma simples área ventral onde os ovos são “colados”, típica do género *Nerophis*, passando por graus diversos de pregas epidérmicas para proteção dos ovos, culminando com a mais especializada estrutura de incubação em peixes, representada pela bolsa incubadora dos cavalos-marinhos (Dawson, 1985).

Nesta família podemos encontrar espécies monogâmicas, tanto a nível social como genético, e espécies altamente poligâmicas (Vincent et al., 1992). Em várias espécies poligâmicas, principalmente nas poliândricas, o tempo investido pelos machos no cuidado pela descendência tem mostrado que este é um fator limitante para o sucesso reprodutivo das fêmeas (Berglund et al., 1989), resultando na predominância da competição entre fêmeas pelo acesso aos machos, ocorrendo então uma inversão dos

papéis sexuais (Vincent et al., 1992). Como tal, em várias espécies, as fêmeas evoluíram elaborados sinais sexuais, tal como pregas cutâneas, coloração e aumento do tamanho corporal (Eens & Pinxten, 2000).

A inversão dos papéis sexuais parece ter surgido várias vezes, de forma independente, desligada do grau de desenvolvimento da bolsa incubadora (Berglund et al., 1986; Vincent et al., 1992). A espécie *Nerophis ophidion*, com uma superfície ventral incubadora simples, apresenta papéis sexuais marcadamente invertidos, ao passo que o cavalo marinho *Hippocampus whitei* exibe papéis convencionais (Vincent, 1994). Os papéis sexuais correlacionam-se melhor com os padrões de acasalamento: espécies poligâmicas, como *N. ophidion* (Jones & Avise, 1997; Jones et al., 1999), apresentam papéis sexuais invertidos, enquanto que espécies monogâmicas, como os cavalos marinhos (Jones et al., 1998; Kvarnemo et al., 2000; Masonjones & Lewis, 2000; Vincent & Sadler, 1995), apresentam papéis sexuais convencionais (Masonjones & Lewis, 2000; Vincent, 1994). Assim, o grau de investimento energético substancial na descendência parece ser uma condição necessária, mas não um pré-requisito suficiente para a inversão dos papéis sexuais.

O tamanho da fêmea é uma característica que evolui com a pressão da seleção sexual e natural, geralmente aumentando a fecundidade da fêmea (Berglund et al., 1986a). O tamanho da fêmea é um sinal importante, tanto para o sexo oposto como para o mesmo sexo, estando positivamente relacionado com a fecundidade e capacidade competição (Berglund & Rosenqvist, 2003). Normalmente, tanto os machos como as fêmeas, preferem parceiros sexuais com maior tamanho corporal (Berglund et al., 1986a) e o sucesso reprodutivo depende do tamanho tanto dos machos como das fêmeas (Berglund, 1991). Além de aumentar a atratividade, as fêmeas maiores dominam sobre as fêmeas mais pequenas (Berglund, 1991), produzem mais e maiores ovos, e os machos maiores acomodam mais descendentes em cada gravidez (Berglund et al., 1986b).

Sendo o macho o principal responsável pelo cuidado parental, seria de esperar a ocorrência de inversão dos papéis sexuais consoante a intensidade do investimento. Contudo, a alteração dos papéis sexuais não está diretamente relacionada com a intensidade do cuidado parental exercido pelo macho. O número de ovos produzidos pela fêmea, a taxa reprodutiva potencial, o espaço disponível nos machos para a incubação e o tempo de gestação, estarão entre os principais fatores limitantes (Silva, 2012).

1.2.1. Espécie em estudo - *Nerophis lumbriciformis*

Nerophis lumbriciformis (Jenyns, 1835) é caracterizado por possuir uma forma fusiforme e pela sua pequena dimensão (comprimento máximo do macho 15 cm; comprimento máximo fêmea 17 cm; Dawson et al., 1986). Esta minhoca pode ser encontrada na zona intertidal rochosa até profundidades de aproximadamente 30 metros, normalmente entre algas na maré alta, ou debaixo de pedras soltas durante a maré baixa (Wheeler, 1969; Monteiro et al., 2002). Pode também ser encontrada em estuários (Almeida, 1994). A sua coloração varia entre castanho, verde e o avermelhado. A sua distribuição percorre a costa atlântica da Noruega até Kattegat e das Ilhas Britânicas até ao sul de Marrocos (Dawson, 1986; ver Figura 2). Alimenta-se de pequenos crustáceos (copépodes, anfípodes e isópodes), sugando-os através do seu focinho (Monteiro et al., 2001; Lyons & Dunne, 2004).

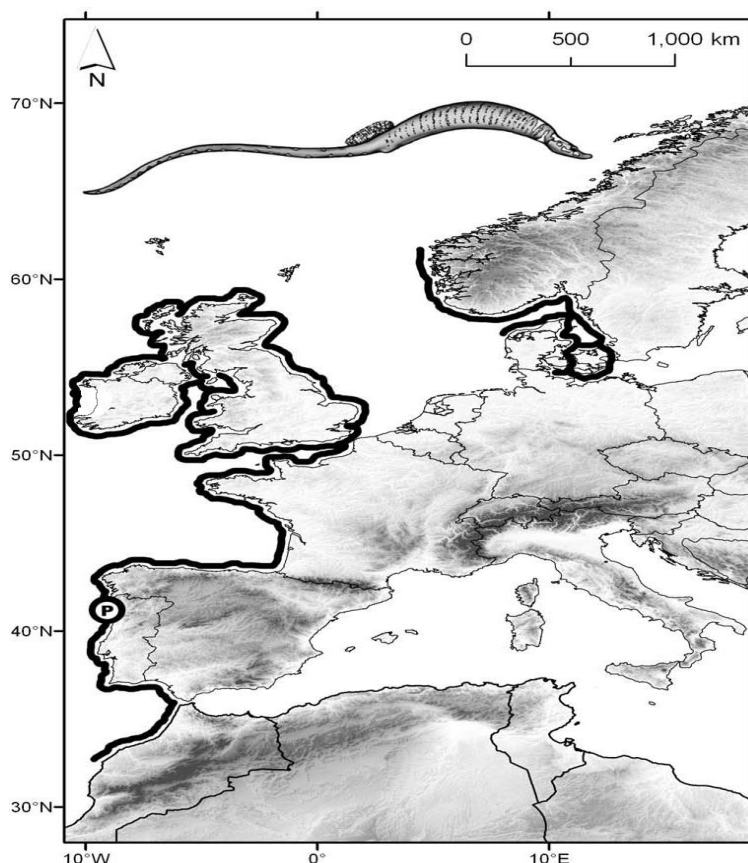


Figura 2. Distribuição biogeográfica de *Nerophis lumbriciformis*, de acordo com Dawson (1986). Imagem de Monteiro & Lyons (2012).

Esta espécie apresenta um claro dimorfismo sexual. É possível reconhecer as fêmeas, geralmente de maiores dimensões, por apresentarem colorações mais exuberantes na zona facial, e um desenvolvimento (em forma de quilha, no abdómen) das

placas ósseas que recobrem o corpo, parecendo, conseqüentemente, mais largas. Os machos apresentam um achatamento na zona ventral do abdómen, formando uma zona incubadora simples, onde serão depositados os ovos. Em termos de estruturas reprodutivas, o macho apresenta a superfície incubadora que, hipoteticamente, mais se aproxima do ancestral que esteve na origem da família (Herald, 1959), visto que esta se baseia apenas numa zona ventral onde os ovos, expostos ao meio exterior (Carpucino et al., 2002), estão aderidos com ajuda de uma substância mucosa (Monteiro et al., 2014). A zona incubadora apresenta uma epiderme semelhante ao restante corpo, com a exceção do grau de vascularização, supondo-se, assim, que a relação pai-embrião seja reduzida ou inexistente.

O ritual de acasalamento desta espécie é basicamente similar ao dos restantes representantes da família, embora apresente características particulares, destacando-se a ausência de movimentações na coluna de água, facto este que poderá ser interpretado como uma adaptação às condições físicas existentes no ambiente intertidal (Monteiro et al., 2002b). Basicamente, o ritual de acasalamento pode ser dividido em três fases distintas (Monteiro et al., 2002): fase inicial (em que as fêmeas assumem um papel ativo, cortejando os machos); deposição dos ovos (período temporalmente curto em que se dá a transferência dos ovos); abraço (período final em que o macho se enrola ao longo do corpo da fêmea). Um macho recebe os ovos de uma fêmea, mas as fêmeas podem acasalar com múltiplos machos durante o intervalo de tempo de uma gravidez (Monteiro, Comunicação pessoal). O dimorfismo sexual presente nesta espécie indicia um sistema poliândrico. Contudo, as observações em campo sugerem que, apesar dos machos não receberem simultaneamente posturas de diferentes fêmeas, acabam por, na mesma época reprodutiva, acasalar com várias fêmeas, indicando um sistema de acasalamento poliginândrico (Monteiro et al., 2006).

Pelo menos no Norte de Portugal, perto do limite sul de distribuição, as fêmeas ocupam locais estratégicos no intertidal, consoante o seu tamanho, que são visitados pelos machos que se querem reproduzir. A zona do intertidal é usada como uma “arena” de reprodução, e machos e fêmeas permanecem lá tempos diferentes, as fêmeas por períodos mais longos (Monteiro et al., 2006). Os machos recebem as posturas e depois seguem para a zona subtidal sem que a fêmea tenha qualquer outro papel a nível do cuidado parental durante todo o período de gestação (Monteiro et al., 2006). O período de gravidez ronda os 30 dias a uma temperatura de 14-15°C (Monteiro et al., 2003). A reprodução dura todo o ano, mas vai diminuindo com o aumento da temperatura da água, terminando quando a temperatura chega acima dos 16°C (Monteiro et al., 2005). O pico reprodutivo desta espécie, em Portugal, ocorre nos períodos de águas mais frias,

entre o Inverno e Primavera (Monteiro et al., 2005). Quando ocorre a eclosão dos recém-nascidos, estes são totalmente independentes dos seus progenitores, apesar de ainda serem morfologicamente diferentes destes, possuindo uma barbatana primordial, barbatanas peitorais e uma coloração transparente (Monteiro et al., 2003). A morfologia dos recém-nascidos sugere um período de tempo passado longe da costa, que antecede o recrutamento para águas mais costeiras (Russell, 1976; Ré, 1999).

1.3. Objetivos

Neste trabalho foi selecionada a marinha *N. lumbriciformis* como modelo experimental, pois esta espécie apresenta uma série de adaptações relacionadas com a reprodução, nomeadamente a gravidez masculina (Herald, 1959), uma marcada inversão dos papéis sexuais e uma expressão de caracteres sexuais secundários em fêmeas.

1.3.1. Objetivos Gerais

O principal objetivo deste trabalho consistiu na avaliação dos diferentes aspectos existentes durante o processo de seleção sexual em *N. lumbriciformis*, agrupando fêmeas de tamanhos e pesos idênticos, mas com colorações distintas, uma vez que esta características é vista como um indicador relevante.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Verificar a natureza plástica dos caracteres sexuais secundários expressos em fêmeas de *N. lumbriciformis*;
- Avaliar se fêmeas com maior expressão de caracteres sexuais secundários apresentam maior sucesso reprodutivo;
- Comparar se o número de ovos/oócitos se altera na 1ª e 2ª gravidez ou na 1ª e 2ª postura perdida e se há diferenças no número total de ovos/oócitos;
- Verificar se a expressão de caracteres sexuais secundários é igualmente influenciada por episódios de perda de posturas ou reproduções com sucesso;
- Verificar se poderá existir investimento paterno aquando da gravidez;

- Atestar o efeito do aumento da temperatura no tempo de gestação do macho e tamanho dos recém-nascidos.

2.Procedimento experimental

2.1. Local de estudo e metodologia na captura dos indivíduos

Os exemplares da minhoca *N. lumbriciformis* foram capturados na zona do intertidal rochoso, entre a cintura de algas castanhas e vermelhas, na praia do Forte da Vigia, em Viana do Castelo, Portugal (41° 41,17 N; 8° 50,35 W; Figura 3). A captura dos indivíduos ocorreu já após o início da época de reprodução, pois pôde-se verificar a existência de machos grávidos. A praia do Forte da Vigia possui características únicas, tais como a existência de uma elevada e diversificada cobertura algal, hidrodinamismo atenuado e existência de pedras roladas que formam um grande número de canais e interstícios, que abrigam uma população residente de *N. lumbriciformis*.



Figura 3. Mapa de Portugal (A) e local de amostragem (B) na Praia do Forte da Vigia, em Viana do Castelo (fonte: Google Earth).

As capturas foram realizadas à mão, sem o auxílio de redes, levantando cuidadosamente as rochas soltas, em períodos de baixa-mar em que a altura do nível médio do mar era inferior a 0,5 m. Durante o processo de amostragem, procedeu-se à identificação direta do sexo dos indivíduos. Os machos podem ser distinguidos pela presença de uma zona incubadora localizada na face ventral do abdómen e as fêmeas, geralmente de maior tamanho, são normalmente mais coloridas e apresentam uma espécie de “quilha” na zona do abdómen. Os juvenis capturados (indivíduos de menor tamanho

onde a distinção entre os sexos não é ainda possível) foram devolvidos ao local de recolha por não serem necessários para a experiência.

Após a captura de cada indivíduo, colocaram-se todas as pedras soltas no seu devido lugar para não afetar o habitat da espécie. No total, foram capturados 78 peixes (41 machos e 37 fêmeas).

2.2. Manutenção da espécie em laboratório

Os indivíduos capturados foram transportados, em arcas isotérmicas, para os aquários localizados no CIBIO. Aí, foram fotografados (Panasonic Lumix DMC-TZ7), conjuntamente com uma régua, para a determinação do seu tamanho corporal e quantificação da coloração facial, e posteriormente distribuídos por aquários de 9,5L num sistema de fluxo contínuo fechado, com água salgada artificial (com uma salinidade entre 30‰ a 35‰ (m/v), e temperatura controlada ($13 \pm 1^\circ\text{C}$). Uma oxigenação adequada foi garantida pela passagem da água por diversas estruturas na zona dos filtros. Com o auxílio de filtros físicos, carvão ativado, leite fluidizado e radiação ultravioleta, foi garantida a qualidade química e biológica da água, regulando assim os níveis de nitrito, nitrato, amónia e pH. Aos aquários foram adicionadas plantas artificiais para simular o habitat natural e permitir alguns locais de refúgio aos indivíduos em estudo.

Diariamente, a alimentação dos indivíduos em estudo consistiu em náuplios recém eclodidos de *Artémia franciscana*.

2.3. Material e Métodos

Trinta e seis fêmeas e trinta e sete machos foram fotografadas e observadas regularmente durante um período de até 5 meses. Como já referido, a determinação do tamanho dos indivíduos e quantificação dos padrões de coloração foi possível por análise do registo fotográfico e com recurso ao software ImageJ (software para processamento e análise de imagens) e para a quantificação dos padrões de coloração usou-se também o programa Gimp (software de edição de imagens), para determinação da área, do número e tamanho das manchas, onde posteriormente à edição das imagens, utilizou-se o ImageJ, para se recorrer à análise das imagens, que permitiu a quantificação dos píxeis tanto da face total como das manchas permitindo obter a percentagem da

área das manchas [(número de pixels das manchas x 100) / número de pixels da face]] como esquematizado na Figura 4.

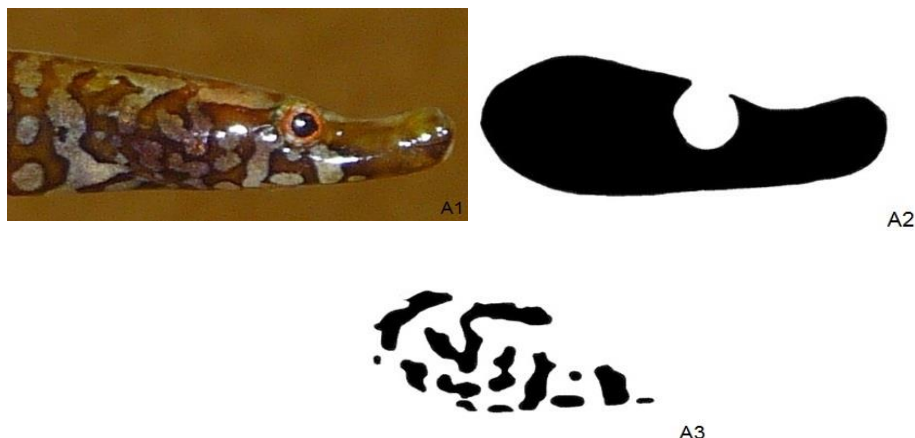


Figura 4. A1- Imagem da face direita de uma fêmea de *Nerophis lumbriciformis*. A2- Imagem monocromática de toda a área da face direita da fêmea da imagem A1, manipulada no programa Gimp. A3- Imagem monocromática das manchas da face direita da fêmea da imagem A1, manipulada no programa Gimp.

Os exemplares de *N. lumbriciformis* foram distribuídos por 18 aquários. Em cada aquário foi colocado um macho e 2 fêmeas, procurando-se agrupar as fêmeas de tamanhos e pesos idênticos, mas com colorações distintas (de acordo com o resultado da nossa amostragem. Uma vez que esta espécie não apresenta efetivos populacionais muito elevados, não foi possível encontrar fêmeas de tamanho e peso similares com diferenças tão marcadas na coloração como seria desejável). Quando, num qualquer aquário, um macho ficava grávido, este era substituído, no mais curto intervalo de tempo, por um outro macho não grávido.

O desenho experimental baseou-se nas seguintes etapas:

- Aquando da introdução das fêmeas e macho em cada um dos aquários, foi tirada uma fotografia de corpo inteiro a cada um dos indivíduos ao lado de uma régua para determinação do comprimento total (Figura 5A) e uma fotografia a cada um dos lados da cabeça para quantificação da área de manchas inicial (Figura 5B). Recorreu-se ainda a uma balança analítica de precisão para pesagem dos indivíduos;

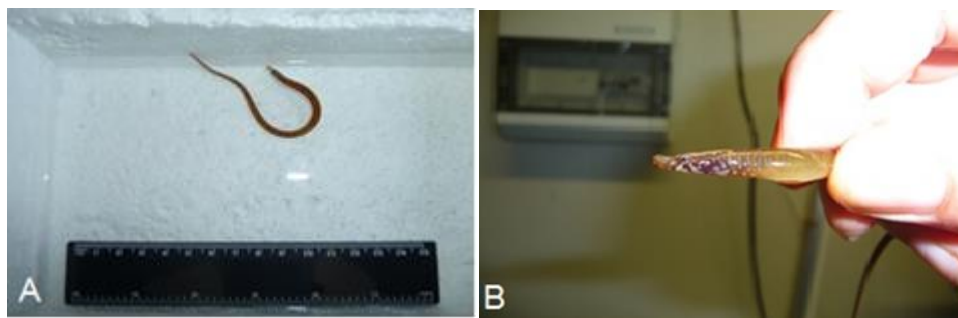


Figura 5. A- Fotografia de corpo inteiro de uma minhoca da espécie *Nerophis lumbriciformis*. B. Fotografia da face esquerda de uma fêmea.

- Passados 15 dias, todos os indivíduos foram novamente pesados e as fêmeas foram fotografadas dos dois lados da cabeça para quantificação da área de manchas.

- Sempre que era registada uma gravidez, o macho grávido era fotografado na zona do abdômen (onde os ovos estão colocados; Figura 6), conjuntamente com uma régua, de modo a permitir a contagem do número de ovos e determinação do seu tamanho (uma vez que os ovos não são perfeitamente esféricos, a área ocupada por um ovo foi determinada recorrendo à fórmula da determinação da área de uma elipse ($\pi * (\text{comprimento}/2) * (\text{largura}/2)$). Finalmente, o macho era pesado para determinação do peso da postura (peso do macho grávido – peso inicial do macho). No caso das fêmeas, aquando de cada gravidez, ambas eram fotografadas para quantificação da área das manchas e depois pesadas. O macho grávido era depois separado das fêmeas e procedia-se à introdução de outro macho no aquário (este macho era previamente pesado e fotografado para determinação do tamanho). Uma semana após a ocorrência de uma gravidez, as fêmeas eram novamente fotografadas e pesadas. Para se obter o tamanho médio dos ovos estes eram medidos com o auxílio do programa ImageJ de onde era retirado o valor do comprimento e da largura de 10 ovos. O cálculo do peso individual dos ovos foi obtido pela seguinte fórmula: (peso do macho na gravidez- peso do macho no início) /número de ovos.



Figura 6. Fotografia da zona incubadora de um macho grávido de *Nerophis lumbriciformis*.

- Sempre que se observava uma perda irreversível de uma série de oócitos que acarreta necessariamente uma diminuição do potencial reprodutivo. Uma vez que as fêmeas iniciam a produção de oogônias primárias exclusivamente antes ou durante o início da época reprodutiva, qualquer deposição de oócitos fora da superfície incubadora de um macho, equivale a uma redução do número potencial de descendentes), as fêmeas eram fotografadas dos dois lados da cabeça para quantificação da área das manchas e estas eram também pesadas. De seguida, a postura perdida era recolhida, com o auxílio de uma rede de aquário, e fotografada para contagem do número de oócitos libertados (Figura 7A). A postura era depois pesada na sua totalidade (peso húmido dos oócitos). Eram ainda retirados 5 oócitos ao acaso e fotografados, conjuntamente com uma régua, e pesados individualmente (Figura 7B). Passado 1 semana, as fêmeas eram novamente fotografadas e pesadas. O tamanho dos oócitos foi medido com o auxílio do programa ImageJ de onde retiramos o valor do comprimento e da largura de cada um dos 5 oócitos e posteriormente no Excel recorremos ao cálculo da área da elipse e por último fez-se a média das áreas e atribuiu-se esse valor ao tamanho dos oócitos. No cálculo do peso individual dos oócitos fez-se uma divisão (peso húmido dos oócitos/número de oócitos).



Figura 7. A- Fotografia de uma postura perdida de uma fêmea. B- Fotografia de um oócito isolado de *Nerophis lumbriciformis*.

- Quando terminado o período de gestação do macho (gravidez), este era separado dos recém-nascidos para evitar o canibalismo da prole, fenómeno já descrito para a família *Syngnathidae* (Cunha et al., 2016). Procedia-se, depois, à pesagem do macho para determinação do peso perdido durante a gravidez (peso após gravidez - peso inicial do macho). Os recém-nascidos recém eclodidos eram sobre-anestesiados (óleo de cravinho), colocados num gobelet de 250 ml e observados numa lupa binocular equipada com uma câmara de vídeo (MAOZUA 5MP 20x-300x Optical Zoom USB Microscope 5MP). Após registo fotográfico individual (Figura 8), era retirada informação do tamanho corporal dos recém-nascidos. O tamanho dos recém-nascidos foi medido através do ImageJ e no fim efetuou-se a média do tamanho de todos os recém-nascidos por macho.



Figura 8. Fotografia de um recém-nascido de *Nerophis lumbriciformis*.

Assim, no decorrer de cada experiência eram recolhidas vários tipos de informação das posturas perdidas (número de oócitos, peso da postura, média do peso individual dos oócitos por postura, média do tamanho dos oócitos por postura, alterações no peso das fêmeas), da gravidez do macho (número de ovos, média do tamanho dos ovos, número de recém nascidos, tamanho dos recém-nascidos, peso da postura, alteração de peso do macho após a gravidez, peso das fêmeas), e da alteração da coloração das fêmeas desde a altura que foram distribuídas nos aquários (dia 0), 15 dias após a sua permanência nos aquários, na altura da gravidez do macho ou das posturas perdidas (e uma semana após cada deposição de oócitos).

Aquando da distribuição das fêmeas, em pares (peso e tamanho similar), pelos aquários, convencionou-se chamar F1 à fêmea mais colorida e F2 à menos colorida. Para avaliar hipotéticas diferenças no tamanho das fêmeas F1 e F2, foi realizado um teste t sobre a diferença de tamanhos (F1-F2) nos vários aquários contra uma constante (0). Quanto maior a similaridade de tamanho das fêmeas, mais a diferença nos comprimentos se aproxima de zero. Para avaliar diferenças no peso e coloração entre as fêmeas F1 e F2, e sua alteração nos primeiros 15 dias da experiência, nos vários aquários, foram realizadas duas Repeated Measures ANOVA com dois fatores, cada um com dois níveis [fêmea (F1 ou F2) e tempo (0 ou 15)]. Estes 15 dias serviram para verificar o potencial impacto de um processo de adaptação das fêmeas aos aquários, traduzido em alterações de peso ou coloração.

De forma a verificar se as fêmeas mais coloridas no início dos ensaios (F1) apresentavam um sucesso reprodutivo distinto e se o número de ovos e oócitos (gravidezes e posturas perdidas) é distinto das fêmeas menos coloridas (F2), foram realizados dois testes de análise de tabelas de contingência com simulação (ACTUS; Estabrook & Estabrook, 1989).

Posteriormente, recorreu-se ao cálculo do coeficiente de Spearman para avaliar de que forma se correlacionavam os dados da coloração das fêmeas, dos machos grávido (pais) e os dados da sincronia entre as fêmeas. Regressões lineares foram utilizadas para relacionar os dados dos machos onde se comparou o número de ovos e o peso do ovo em relação ao peso da postura do macho, peso do macho depois da gravidez e o peso perdido pelo macho no início da experiência até ao fim da gravidez e por ultimo relacionou-se o peso da postura com o peso perdido pelo macho no início da experiência até ao fim da gravidez. Também se utilizaram regressões lineares para a coloração onde se relacionou o peso do oócito, tamanho do oócito e o peso húmido da postura com os ganhos e perdas de coloração da fêmea na altura da perda da postura,

tamanho do oócito e com o tamanho da fêmea. Em relação à sincronia entre fêmeas, foram usadas regressões lineares entre o peso e a coloração, entre uma e outra fêmea, no momento da gravidez do macho e no momento da postura perdida para o substrato. Por ultimo, relacionou-se a temperatura de gravidez com o período de gestação e o tamanho dos recém-nascidos. Também se utilizou o teste não paramétrico Wilcoxon matched pairs test com o objetivo de se comparar o número de ovos colocados pelas fêmeas na 1ª e na 2ª gravidez e número de oócitos libertados pelas fêmeas na 1ª e 2ª postura. Por fim recorreu-se ao teste não paramétrico de Mann-Whitney para avaliar as diferenças entre o número total de oócitos e número total ovos.

2.4. Caracterização sumária da amostra em estudo

Durante os ensaios experimentais foram utilizados setenta e três espécimes de *N. lumbriciformis*, provenientes de Viana do Castelo. O tamanho dos machos variou entre 10,693 e 14,002 cm ($12,157 \pm 0,739$ cm, média e desvio padrão) e o peso variou entre 0,616 e 1,096 g ($0,875 \pm 0,125$ g). Já as fêmeas apresentaram um tamanho que variou entre 10,656 e 14,437 cm ($12,648 \pm 0,801$ cm) e um peso entre 0,675 e 1,479 g ($1,059 \pm 0,199$ g).

2.5. Análise de parentesco

2.5.1. Extração do ADN

Para determinar qual das duas fêmeas presentes num aquário era responsável pela gravidez de um macho, foram realizadas análises de parentesco. Uma vez que os animais eram seguidos por períodos de tempo prolongados, foi aplicado um procedimento de recolha de DNA muito pouco invasivo, semelhante às técnicas descritas em Le Vin et al., 2011; Martin-Galvez et al., 2011; Prunier et al., 2012. *Swabs* bocais (Isohelix SK2) foram usados para retirar amostras de muco da superfície externa dos peixes, contendo células epiteliais. Esta é uma técnica de amostragem muito pouco invasiva (ver detalhes adicionais em Monteiro et al., 2014), em contraste com métodos que requerem o corte de uma pequena quantidade de tecido (ex: corte de uma porção da barbatana), e consiste numa fricção de um *swab* sobre a superfície dorsal ou ventral,

evitando a cabeça (para prevenir lesões no olho ou no opérculo) e a papila genital (evitando-se assim a contaminação fecal). Adquirem-se, assim, amostras de ADN sem colocar em risco a sobrevivência dos indivíduos. Para além das amostras das fêmeas e macho grávido, procedeu-se também à recolha dos embriões em desenvolvimento. Todas as amostras foram imersas em etanol 96% e transferidas para o laboratório para o armazenamento a -20 °C. Um kit comercial (kit Genomed JET quick tissue DNA spin kit) foi usado para extrair o ADN das células epiteliais capturadas em cada esfregão, seguindo as instruções do fabricante (ver detalhes em Monteiro et al., 2014). Uma vez que era necessário atribuir a maternidade dos embriões apenas a uma de duas fêmeas, e dada a variabilidade dos microssatélites já testados nesta espécie, não era essencial a informação paterna. No total, foram reunidas 61 amostras de ADN (32 fêmeas, 26 embriões, 3 machos) para as subseqüentes análises de parentesco.

2.5.2 Seleção de microssatélites e amplificação por reações em cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras foram amplificadas para quatro microssatélites Nerlum_02383 (GenBank accession number: KF317543) (F:FAM-GGTGCCTTCAAAA-TGTGTGC,R:GCAGGTACGACACATACACTC), Nerlum_07690 (KF317544) (F:FA-MTTGTAAACAGTAGAGAAAGCCAGR:GGCAAGCTGAGGCTTTTAGG),Nerlum_12901 (KF317547) (F:FAM-AAGGGAACGCAAGTCAAAGC R:AC-GAGAAGGCGAAAGACTCC) e Nerlum_00629 (KF317548) (F:FAM-GTGAGAGTCA-GCAACCATGC R:GTCAACTCTTGCGGGAATCG). Cada locus é amplificado utilizando um par de primers, em que um deles está marcado com um fluoróforo que permite a sua visualização quando são genotipados pelo sequenciador. Neste caso, o loci Nerlum_02383 estava marcado com um fluoróforo verde chamado VIC, o loci Nerlum_07690 estava marcado com um fluoróforo azul chamado FAM, o Nerlum_12901 estava marcado com um fluoróforo vermelho chamado PET e o loci Nerlum_00629 estava marcado com um fluoróforo amarelo chamado NED. Para além de possibilitar a visualização dos loci, o fluoróforo permite que consigamos determinar qual o seu tamanho, que poderá ser diferente para cada indivíduo.

Todas as amplificações foram efetuadas com um volume de reação de 10 µl, contendo 1µl de ADN, 1 µl de buffer de reação de PCR (Invitrogen), MgCl₂ 1.5 mm, 0.2 mM mix ddNTP, 0.8 µl de primer reverse e 0,8 µl de primer forward, 0,8 µl de tail e 0.1

μ l de Taq polymerase (Invitrogen) (Monteiro et al., 2014). O perfil térmico de PCR utilizado para amplificar todos os microssatélites começou com uma desnaturação inicial a 95 °C durante 15 minutos, que se seguiu de 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 56 °C durante 45 s e 72 °C durante 45 s. A tail fluorescente identificada foi incorporada durante oito ciclos adicionais (95 °C durante 30 s, 53 °C durante 45 s e 72 °C durante 45 s), que foram seguidos por um passo de extensão final a 72 °C durante 30 minutos. As reações de PCR foram realizadas num Bio-Rad MyCycler™. Os produtos de PCR amplificados nesse estudo foram separados em gel de agarose a 2% (10g de agarose, 500 ml de TBE, 10 μ l gel red). Estas amostras foram sujeitas entre 20 a 25 minutos a 140 V, seguida da visualização num transiluminador de luz ultra-violeta. A solução tampão utilizada para a eletroforese foi o TBE.

2.5.3 Genotipagem dos produtos de PCR

Antes de se preparar a amostra para sequenciação, foi necessário fazer um reajuste, adicionando 5 μ l de H₂O ultrapura a algumas amostras e noutras retirando 1,5 μ l da amostra, de acordo com a concentração de DNA. Em cada poço adicionou-se 10 μ l de formaldeído com Liz (1 ml de formaldeído para 10 μ l de Liz 500 size standard) e 1,2 μ l do produto de PCR. De seguida fez-se um short spin de 30 segundos para que todo o líquido escorresse para o fundo dos poços. A placa multi-poços (com 96 poços) foi imediatamente colocada no frigorífico até genotipagem das amostras no sequenciador (sequenciador capilar ABI 3100). Para leitura dos microssatélites e obtenção dos génotipos de fêmeas, machos e recém-nascidos, foi utilizado o programa Peak Scanner.

3. Resultados e Discussão

3.1. Correlações iniciais e sucesso reprodutivo

As fêmeas de cada um dos pares introduzidos nos vários aquários, tal como pretendido, e independentemente do tempo de medição (Repeated Measures Anova: $F(1,32) = 0,042$; $P=0,839$), apresentavam pesos idênticos (Repeated Measures Anova: $F(1,32) = 2,156$; $P=0,152$) sem alteração nas primeiras semanas (Repeated Measures Anova: $F(1,32) = 0,426$; $P=0,518$). A diferença de tamanho entre as fêmeas F1 (mais colorida) e F2 (menos colorida) também não foi diferente de zero (Teste t contra 0: $n=17$; $t=2,024$; $df=16,123$; $P=0,059$). A coloração, no entanto, diferiu entre as fêmeas do par (F1 e F2), o que era já expectável uma vez que pretendíamos, à partida, uma assimetria no grau de coloração (Repeated Measures Anova: $F(1,30) = 16,681$; $P<0,001$). Ao contrário do peso, registou-se uma alteração no grau de coloração, num intervalo de 15 dias (Repeated Measures Anova: $F(1,30) = 14,174$; $P<0,001$), subindo a área de manchas faciais em ambas as fêmeas (F1 e F2).

Tendo em conta que o desenho experimental apresentado envolve condições muito diferentes daquelas que os indivíduos encontram no campo (temos apenas duas fêmeas, por aquário, para apenas um macho), não se tratando de uma experiência de mesocosmos, deve-se realçar que os padrões de resultados obtidos não podem ser diretamente contrastados com os dados oriundos de populações naturais. No entanto, os ensaios realizados forneceram informações relevantes que permitem, entre outros aspetos, verificar a natureza plástica dos caracteres sexuais secundários expressos nas fêmeas de *N. lumbriciformis*.

Tendo em conta os resultados obtidos em populações naturais desta espécie, que mostram que a coloração das fêmeas é um indicador fiável da sua qualidade intrínseca (ex: grau de coloração facial está intimamente associada ao índice gonadossomático; fêmeas mais coloridas apresentam maior sucesso reprodutivo e maior fitness; resultados ainda não publicados), seria expectável que, caso este carácter sexual secundário fosse estável ao longo da época de reprodução, as fêmeas mais coloridas em cada aquário (F1) diferissem das outras fêmeas ao apresentarem maior sucesso reprodutivo e produção de oócitos. Uma das primeiras conclusões que podemos retirar dos nossos resultados é a de que não existiram diferenças no número total de episódios reproduti-

vos (gravidezes e posturas perdidas) entre as fêmeas F1 e F2 (ACTUS- Análise de tabelas de contingência com simulação: $\chi^2 = 0,004$; $df = 3$; $P = 0,957$). Também não foram encontradas diferenças no número médio de gametas produzidos (n° total de gametas / n° total de episódios reprodutivos) entre os dois tipos de fêmeas (ACTUS: $\chi^2 = 2,837$; $df = 3$; $P = 0,918$). O padrão geral de resultados é semelhante se, em vez de considerarmos as fêmeas mais coloridas à partida versus a menos colorida (com base nas quantificações efetuadas no início de cada ensaio), o fizermos com a fêmea mais e menos colorida no momento do episódio reprodutivo. Por exemplo, uma fêmea F1, mais colorida no início do ensaio, pode ser ultrapassada em coloração pela fêmea F2, uma vez que se verificou evolução considerável na área das manchas ao longo da experiência (resultados que serão abordados mais à frente). Assim, mesmo comparando o número de episódios reprodutivos da fêmea mais colorida (no instante em que ocorreu o episódio) ou o número médio de gametas produzidos, também não foram encontradas diferenças.

Esta semelhança entre fêmeas mais ou menos coloridas podem, hipoteticamente ser explicadas de várias formas distintas: a) a escolha por parte do macho ser independente do grau de coloração da fêmea; b) as fêmeas capturadas e usadas nos vários ensaios não possuem diferenças suficientemente marcadas na coloração que permitam ao macho fazer uma escolha inequívoca; c) o nosso desenho experimental ser tão diferente das possíveis condições no campo que dificulte a visualização de um processo claro de escolha.

Os dados que conhecemos da população de Viana, seguida há mais de uma década e com determinação do sistema de acasalamento já efetuada (mas cuja informação não está ainda publicada), mostram que o sistema reprodutivo desta espécie se aproxima a um lek (sistema de acasalamento onde ocorre agregação clara de um sexo, que é visitado por elementos do outro sexo com a única finalidade de se reproduzir). Neste caso, trata-se de um lek invertido, um caso raro na natureza, onde são as fêmeas que se agregam e os machos que visitam as agregações. Dados genéticos obtidos pela equipa com quem desenvolvi este trabalho demonstram que, no campo, apenas um grupo muito restrito de fêmeas, aquelas com colorações muito desenvolvidas, monopoliza a reprodução (cerca de 60% das gravidezes numa época de reprodução são oriundas de cerca de 19% das fêmeas existentes naquele local). Assim, torna-se difícil imaginar que os machos, que nesta espécie não podem ser coagidos a engravidar contra a sua própria vontade, não tenham preferências marcadas por fêmeas com colorações mais elaboradas.

No campo, as fêmeas encontram-se geralmente agregadas em locais específicos do intertidal (leks), estando as fêmeas mais coloridas próximas do centro e as fêmeas com colorações menos desenvolvidas junto da periferia. Os machos não grávidos tendem a reunir-se fora do lek e dirigem-se posteriormente para o centro, onde acontecem normalmente os episódios reprodutivos. Após ficarem grávidos, os machos dispersam novamente para fora do lek. É provável que, durante estas micro-migrações para o interior do lek, os machos tenham oportunidade de encontrar fêmeas com graus de coloração muito dispares. Esta capacidade de comparar fêmeas com colorações pouco ou muito desenvolvidas pode ser essencial para o processo de escolha. Por exemplo, Silva et al. (2009) mostra que, numa outra espécie de *Syngnathidae* (*Syngnathus abaster*), as fêmeas só alteram as suas estratégias reprodutivas quando simultaneamente expostas a machos com fenótipos claramente distintos. Caso contrário, as estratégias reprodutivas são similares para todos os tipos de machos, independentemente do fenótipo preferido. No nosso caso, a pequena diferença de coloração entre fêmeas, ou a ausência de diversos tipos de fêmeas com distintos tipos de coloração em simultâneo, pode ter contribuído para uma não expressão clara da preferência por parte dos machos. Tendo em conta o que foi acima referido, é provável que o desenho experimental selecionado (2 fêmeas para 1 macho) seja tão distinto das condições que normalmente são encontradas no campo, que possa ter impedido a observação e quantificação das preferências dos machos no momento da escolha do parceiro.

3.2. Coloração

3.2.1. Será que fêmeas maiores e mais coloridas podem transferir melhores oócitos para os machos?

É sabido que as alterações na coloração das fêmeas são suscetíveis de indicar, de uma forma rápida e plástica, o grau de investimento na reprodução, nomeadamente, um maior decréscimo de coloração pode indiciar um maior investimento no peso dos oócitos (Fitzpatrick et al., 1995). Uma vez que os oócitos são energeticamente ricos, servindo de base ao desenvolvimento dos recém-nascidos, é expectável que os caracteres sexuais das fêmeas possam indicar a qualidade dos seus gâmetas e, simultaneamente, possam também traduzir o custo associado a cada episódio de reprodução.

A relação entre a coloração dos syngnatídeos e a qualidade das suas posturas tem sido descrita por vários autores (Silva et al., 2007 & 2009, Monteiro et al., 2014). Em *N. lumbriciformis*, foi detetada uma correlação, negativa, entre a diferença de coloração no momento da perda da postura e no momento anterior à perda da postura e o peso dos oócitos ($R = -0,603$; $P < 0,005$; equação: $y = -1,8599 \cdot 10^{-5}x + 0,0012$; Figura 9). Posturas com oócitos mais pesados implicaram maior perda de coloração por parte da fêmea, indicando que a maturação de uma postura parece implicar custos que reduzem a atratividade da fêmea.

Reforçando a correlação acima referida, também se verificou uma correlação negativa entre a diferença de coloração no momento em que ocorre a perda de postura e antes de ocorrer a perda de postura e o peso húmido dos oócitos ($R = -0,513$ e $P < 0,005$; equação $y = -0,0017x + 0,044$; Figura 9). Estes resultados sugerem, pois, que o investimento de uma fêmea no peso (qualidade) dos oócitos e/ou da postura implica perdas rápidas de coloração.

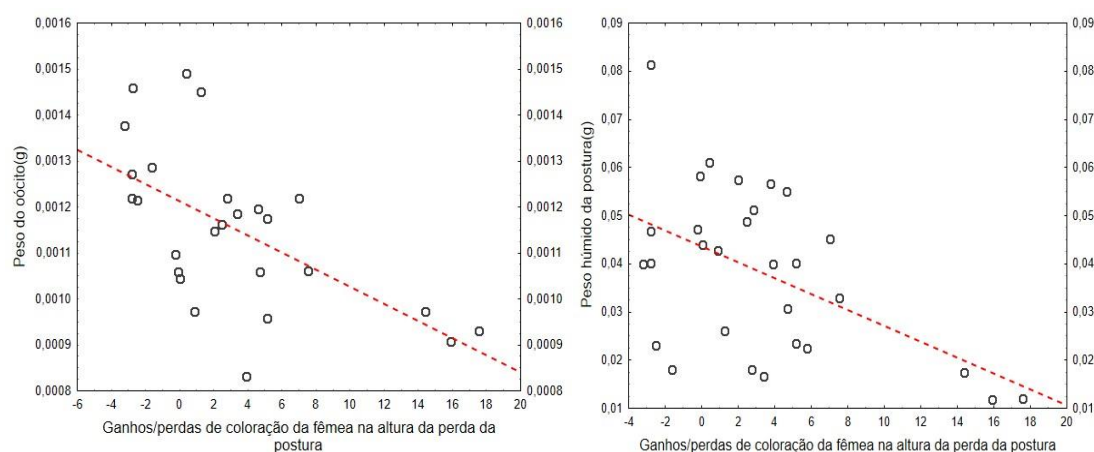


Figura 9. Relação entre o peso do oócito e peso húmido da postura e alterações de coloração das fêmeas de *Nerophis lumbriciformis* aquando da perda de uma postura.

Simultaneamente, verificamos que quanto menos peso a fêmea tiver perdido, maior era o tamanho dos oócitos ($R = 0,471$ e $P < 0,005$; equação $y = 3,5198x + 1,3098$; Figura 10).

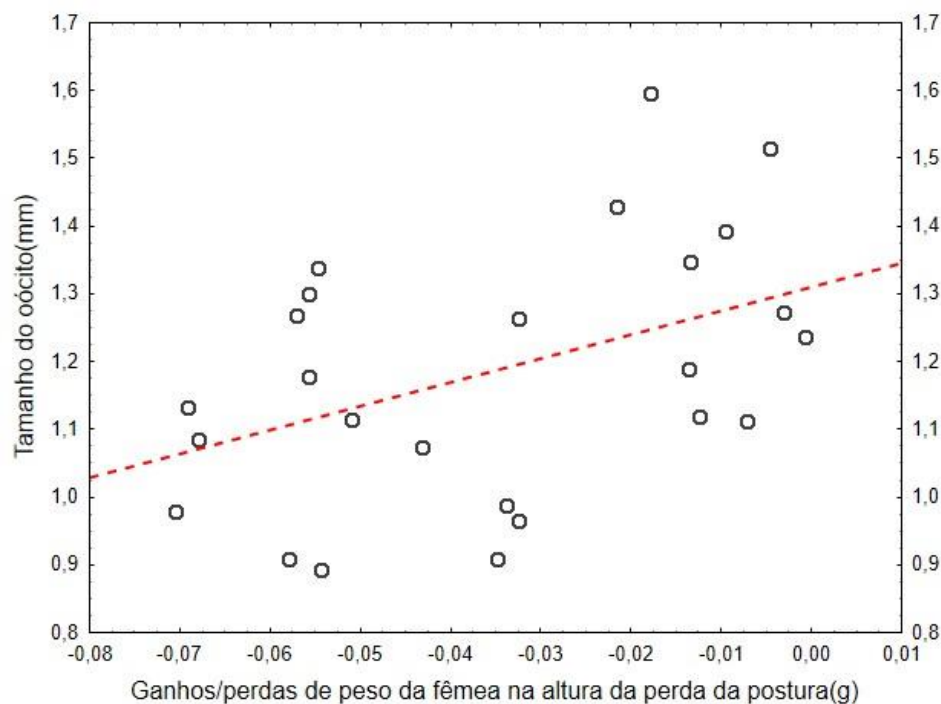


Figura 10. Relação entre o tamanho médio do oócito e as perdas de peso das fêmeas de *Nerophis lumbriciformis* aquando da perda de posturas.

Para complementar e reforçar ainda mais os resultados obtidos, verificou-se que as fêmeas maiores foram aquelas que libertaram oócitos maiores ($R = 0,399$ e $P < 0,05$: equação $y = 0,0807x + 0,1341$) e quanto maior era o tamanho do oócito, maior era o seu peso ($R = 0,602$ e $P < 0,001$: equação $y = 0,0006x + 0,0004$; Figura 11).

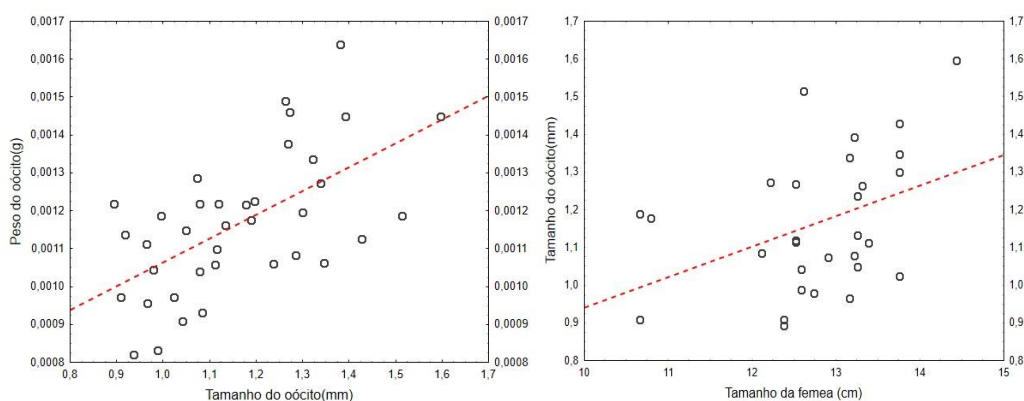


Figura 11. Relação do tamanho dos oócitos e o seu peso ou tamanho das fêmeas de *Nerophis lumbriciformis*.

O tamanho dos gâmetas femininos é importante, também em *Syngnathidae*, uma vez que foi já demonstrado que ovos maiores dão origem a descendentes maiores e com maiores possibilidades de sobreviverem à predação (Ahnesjö, 1992a, b). Berglund

et al., (1986) refere que o desempenho reprodutivo depende do tamanho corporal, tanto em machos como em fêmeas, com fêmeas maiores a produzirem mais e maiores ovos, e machos maiores a acomodarem mais ovos.

Sabe-se que o investimento em ornamentos sexuais é muitas vezes feito à custa do potencial reprodutivo (honestidade dos caracteres sexuais secundários) (ver Fitzpatrick *et al.*, 1995). Assim, é importante que o repertório de caracteres sexuais secundários transmita informação fidedigna do potencial reprodutivo em tempo real, variando a expressão de acordo com a condição em cada altura. Os dados aqui reunidos parecem atestar a honestidade da informação veiculada pela coloração das fêmeas, que varia de acordo com a condição das fêmeas.

3.3 Ovos e oócitos

3.3.1. Serão as fêmeas capazes de minimizar, no seu potencial reprodutivo, o impacto negativo de uma perda de oócitos?

A perda irrecuperável de uma série de oócitos, como acontece numa postura perdida, acarreta necessariamente uma diminuição do potencial reprodutivo. Uma vez que as fêmeas iniciam a produção de oogónias primárias exclusivamente antes ou durante o início da época reprodutiva (Lahaye, 1971), qualquer deposição de oócitos fora da superfície incubadora de um macho, equivale a uma redução do número potencial de descendentes. Como anteriormente referido, não é incomum, em *N. lumbriciformis*, observarmos perdas de uma série de oócitos. Este comportamento, aparentemente sem qualquer valor adaptativo, pode derivar do facto de a fêmea necessitar de proceder à hidratação dos ovos imediatamente antes da deposição no corpo do macho. Qualquer interrupção importante do ritual de corte e acasalamento (após hidratação da postura a transferir), causada por outra fêmea ou desinteresse do macho, parece implicar a inevitabilidade de perda de oócitos. Talvez por isso o comportamento reprodutivo desta espécie seja tão ritualizado, permitindo à fêmea deduzir o real interesse do macho. Como curiosidade, numa outra espécie filogeneticamente próxima, *N. ophidion*, os machos alteram a coloração do focinho para amarelo, mostrando de forma mais conspícua a sua intenção em reproduzir-se.

Se as fêmeas forem capazes de minimizar o número de oócitos perdidos, reduzindo as perdas e o impacto no fitness potencial, é possível que seja observada uma diferença marcada no número de oócitos perdidos nas libertações (por exemplo, uma redução de perdas entre a primeira e segunda postura perdida, uma vez que o número de oócitos disponíveis vai sendo gradualmente reduzido ao longo da época de reprodução). Alternativamente, se as fêmeas estiverem “pré-programadas” para maturar e hidratar um número constante de oócitos (aquele que hipoteticamente será desejável para ocupar a superfície incubadora de um macho), é possível que a variabilidade no número de oócitos perdidos entre posturas seja muito reduzida. Se as fêmeas forem, de facto, capazes de promover a minimização das perdas, o número de oócitos das posturas perdidas será sempre menor do que aquele que é passado para um macho.

Ao avaliar o número de oócitos que fêmeas “desperdiçaram” em dois episódios de perda de posturas (duas posturas perdidas pela mesma fêmea; Figura 12), verificou-se que o número de gametas perdidos entre posturas perdidas é similar (Wilcoxon Matched Pairs test: $n=5$; $Z=0,674$ e $p=0,500$).

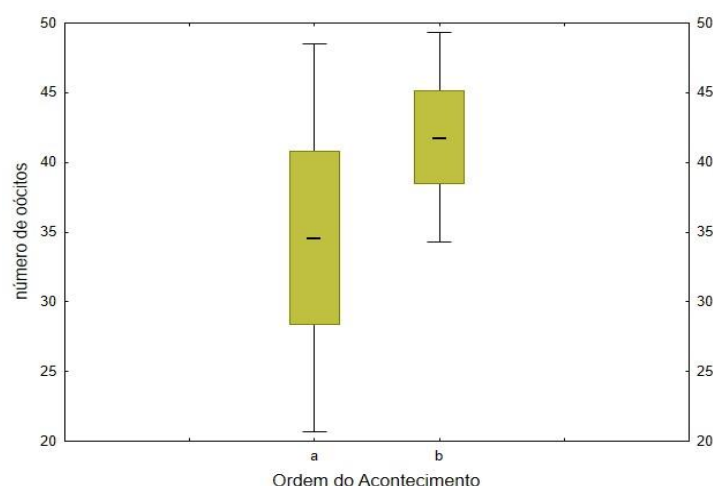


Figura 12. Número de oócitos libertados por fêmeas de *Nerophis lumbriciformis* em duas posturas perdidas (a-primeira postura perdida; b-segunda postura perdida).

Estes resultados sugerem, ainda que o número de observações seja reduzido, que o número de oócitos depositados no substrato é constante entre posturas. Esta constância no número de gametas libertados pela fêmea verificou-se também nas gravidezes. Aqui foram seleccionadas fêmeas com maternidades geneticamente confirmadas, e quantificado o número de gametas passados ao macho numa primeira e segunda gravidez (Wilcoxon Matched Pairs test: $n=8$; $Z=1,330$ e $p>0,05$; Figura 13).

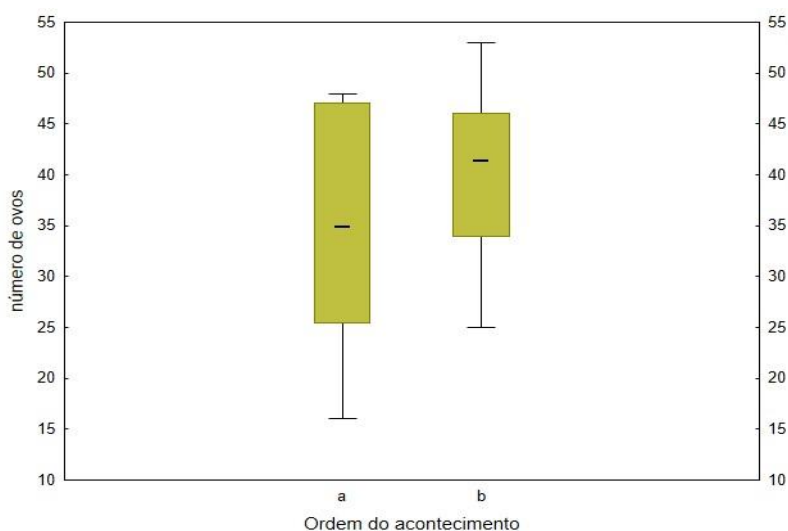


Figura 13. Número de ovos colocados por fêmeas de *Nerophis lumbriciformis* em duas gravidezes (a-primeira gravidez; b-segunda gravidez).

Novamente, verificou-se que o número de gametas transferido era similar entre as gravidezes. Para verificar se o número de oócitos perdidos é similar ao número de oócitos transferidos com sucesso para o macho, comparamos o número de ovos (observado nas gravidezes ocorridas em aquário) com o número de oócitos em episódios de posturas perdidas. Se as fêmeas não forem capazes de reduzir o número de oócitos perdidos (ou seja, as fêmeas maturam uma postura inteira independentemente de saberem se são capazes de a colocar, com sucesso, no macho), espera-se que não existam diferenças entre o número de oócitos transferidos com sucesso para o macho (gravidez) e o número de oócitos perdidos para o substrato (quando o acasalamento é interrompido). Verificou-se que, de fato, não existiram diferenças significativas entre o número oócitos perdidos e o número de ovos transferidos para o macho (Mann-Whitney U-Test: $N_{\text{ovos}}=39$ e $N_{\text{oócitos perdidos}}=35$, $U=579,500$, $Z=1,110$ e $P>0,05$; Figura 14).

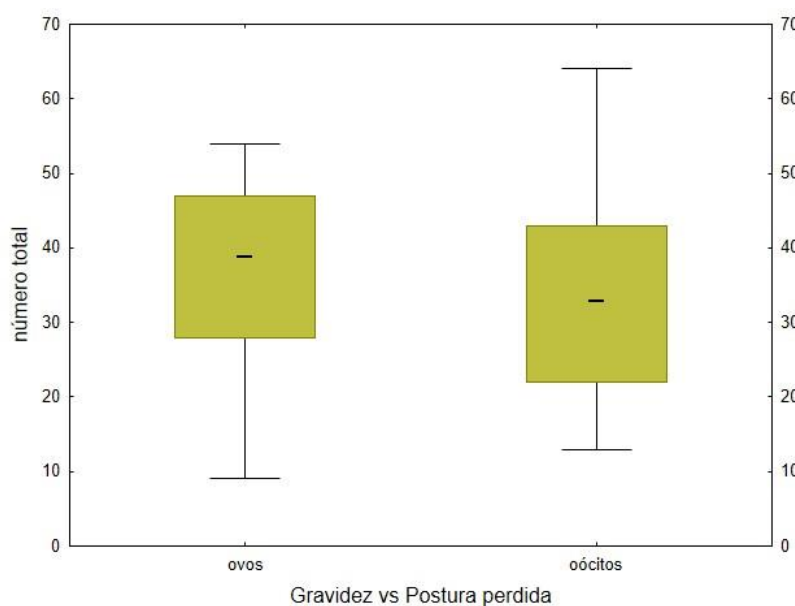


Figura 14. Comparação entre o número total de oócitos perdidos e o número total de ovos em *Nerophis lumbriciformis*

Este resultado não é inteiramente inesperado uma vez que o cenário mais previsível era aquele em que as fêmeas preparam uma postura para colocar num macho, hidratando um determinado número de oócitos que serão inteiramente perdidos caso o acasalamento não tenha sucesso. Assim, esperava-se, e verificou-se, que a perda de oócitos fosse similar ao número de ovos presentes nos machos. Assim, ainda que fosse preferível, para as fêmeas, a redução total, ou mesmo apenas parcial, das perdas, os nossos resultados parecem reforçar a importância crucial do ritual de corte em duas perspectivas distintas: a) como janela temporalmente curta onde a fêmea tem de inequivocamente perceber a real receptividade do macho, ou b) como arena privilegiada de competição entre fêmeas, onde o sucesso das disrupções provocadas por uma fêmea pode acarretar perdas consideráveis para outra.

Estes resultados, obtidos em laboratório, são sobretudo interessantes porque a visualização de posturas perdidas no campo é praticamente impossível. O hidrodinamismo típico do ambiente intertidal impossibilita a observação de posturas perdidas de minúsculos oócitos, que são, provavelmente, rapidamente dispersos e/ou servem de alimento à fauna local.

É comum, na família *Syngnathidae*, o estabelecimento de hierarquias entre fêmeas, o que facilita o acesso a machos disponíveis a acasalar às fêmeas dominantes (Berglund & Rosenqvist, 1990). Além de mais atrativas, as fêmeas maiores dominam sobre as fêmeas mais pequenas (Berglund et al., 1991), produzindo mais e maiores

ovos (Berglund et al., 1986b). O sistema de acasalamento em lek observado na população de Viana (de onde estas fêmeas foram retiradas), com fêmeas de qualidade superior (como indiciado pelo tamanho e coloração) agregadas no centro da área reprodutiva, pode indiciar um local de competição extrema entre fêmeas, podendo-se justificar, assim, a quase inexistência de fêmeas de pequenas dimensões ou de baixa coloração. Uma vez que a perda de posturas ocorre noutras espécies de syngnatídeos (Berglund & Rosenqvist, 2003), os padrões de resultados aqui apresentados podem ser interessantes na comparação com espécies com sistemas reprodutivos distintos.

3.4. Sincronia

3.4.1. Poderão as fêmeas influenciar-se mutuamente na expressão de caracteres sexuais secundários?

A família *Syngnathidae* apresenta frequentemente papéis sexuais revertidos (Berglund & Rosenqvist, 1993), definido como a situação em que a competição por acasalamento é mais intensa entre fêmeas do que entre machos (Vincent *et al.*, 1992). Nesta situação, a seleção sexual irá causar efeitos mais significativos nas fêmeas (e nos seus caracteres sexuais secundários, como o tamanho e a ornamentação) do que nos machos (Williams, 1975).

Sabe-se hoje que as fêmeas de *N. lumbriciformis* se distribuem consoante o seu tamanho e coloração em locais estratégicos que são visitados pelos machos que se querem reproduzir. A zona do intertidal é usada como uma “arena” de reprodução, e machos e fêmeas permanecem lá tempos diferentes, as fêmeas por períodos mais longos (Monteiro *et al.*, 2006). O maior tempo passado no intertidal, em proximidade com outras fêmeas, abre a possibilidade de, pelo menos neste local de maior agregação, as fêmeas se poderem influenciar mutuamente (por exemplo, através de competição intrasexual).

Ao analisar os dados da coloração e peso, antes e no momento da gravidez ou perdas de postura, de pares de fêmeas que contactavam com um macho, verificou-se que, quando uma fêmea engravidava um macho, esta geralmente via alterada a sua coloração e peso (desde logo pela ejeção de uma postura de vários oócitos). Num ambiente de competição por oportunidades de acasalamento, seria de esperar que a outra fêmea aproveitasse a oportunidade para aumentar a sua coloração e peso. No entanto,

inesperadamente, verificou-se o contrário: a fêmea que não ejetou oócitos viu a sua coloração e peso seguir o mesmo padrão da sua “competidora”. O mesmo padrão de sincronia foi verificado aquando da perda de posturas. Assim, observou-se uma correlação significativa entre a coloração das fêmeas que colocaram ovos no macho e as fêmeas que não conseguiram colocar ovos ($R = 0,843$ e $P < 0,001$: equação $y = 0,6568x + 0,2836$), o mesmo acontecendo no peso ($R = 0,636$ e $P < 0,01$: equação $y = 0,5678x + 0,0033$; Figura 15). Nas perdas de postura, observamos a mesma correlação tanto para a coloração ($R = 0,605$ e $P < 0,001$: equação $y = 0,6236x + 1,1439$) como para o peso ($R = 0,506$ e $P < 0,01$: equação $y = 0,5175x + 0,0217$; Figura 16).

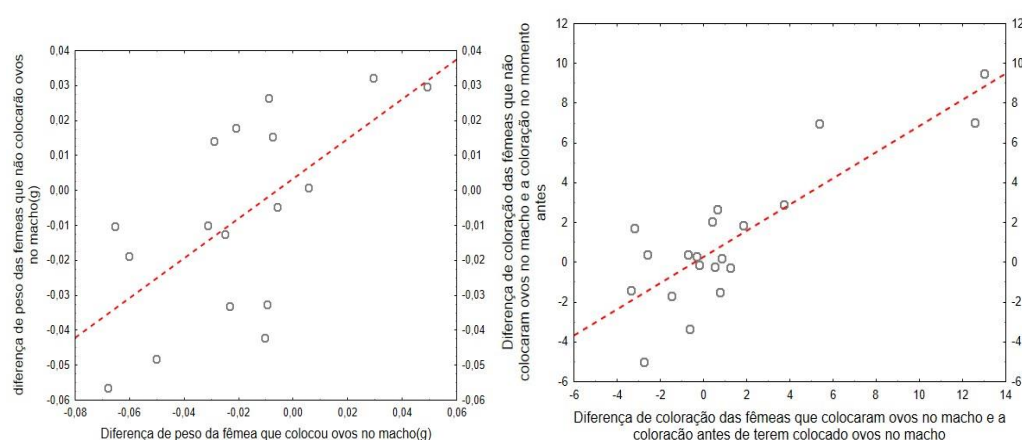


Figura 15. Relação entre o peso e a coloração da fêmea que engravidou o macho e a coloração e peso da outra fêmea (diferença de peso no momento da gravidez do macho e o momento anterior à gravidez).

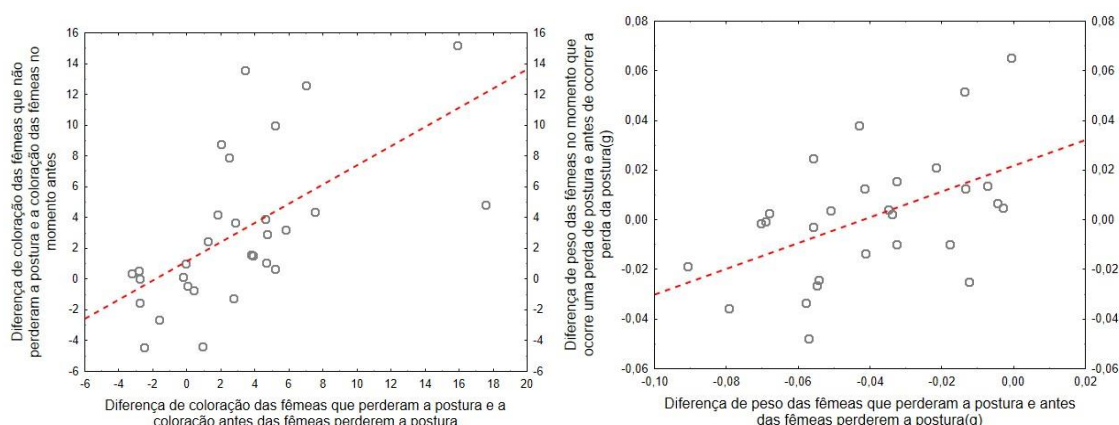


Figura 16. Relação entre a coloração e peso da fêmea que perdeu a postura e a coloração e peso da outra fêmea (diferença de coloração no momento da perda da postura e o momento anterior à perda da postura).

Contrariando a nossa hipótese inicial, que seguia uma lógica de competição entre as fêmeas pelo acesso a hipóteses de reprodução presentes e futuras (uma fêmea

perde e a outra ganha), verificamos uma aparente sincronia na coloração e no peso entre fêmeas. Este resultado inesperado levanta questões interessantes: qual o significado adaptativo de tal sincronia? Que mecanismos explicarão esta aparente sincronia?

Sabemos, pelos nossos registros, que as alterações simultâneas não são devidas a dois episódios simultâneos de ejeção de oócitos (por exemplo, uma fêmea poderia engravidar um macho e a outra perder uma postura, o que explicaria as alterações síncronas). Também sabemos, por dados genéticos, que uma gravidez de um macho resulta apenas de uma fêmea. No género *Nerophis*, os machos aceitam apenas posturas de uma única fêmea (McCoy et al., 2001; dados para *N. lumbriciformis*, ainda não publicados, indicam o mesmo resultado).

A perda de coloração e de peso de uma fêmea que libertou oócitos é expectável (já verificamos que passagem de uma postura a um macho ou perda de postura para o substrato implicará gastos similares, pois o número de gâmetas maturado é semelhante). Já a perda paralela de peso e de coloração da outra fêmea é aparentemente de mais difícil explicação. Como hipóteses mutuamente não exclusivas, pode-se aventar que a sincronização da fêmea que não se reproduziu (ou perdeu posturas) pode derivar dos gastos energéticos relacionados com a competição intrasexual ou ser derivada de fenómenos fisiológicos relacionados com a resposta a feromonas. Segundo Gonçalves de Freitas *et al.* (2009) a comunicação química desempenha um papel importante, estando os sinais químicos envolvidos nos processos comunicativos durante o acasalamento, em diversas espécies de peixes. Almeida *et al.* (2005) mostrou que o macho de *Oreochromis mossambicus* liberta pulsos de urina na presença da fêmea. Estudos recentes demonstraram que, na urina dos peixes, podem estar presentes feromonas (Barata, 2007) e que estas feromonas refletem o estado reprodutivo de quem as liberta e afetam a fisiologia reprodutiva e o comportamento do recetor (Stacey, 2006).

Segundo cremos, esta é a primeira vez que se verifica um grau marcado de sincronia em fêmea de syngnatídeos e esta observação abre um novo campo de investigação. É um assunto importante pois o investimento de uma fêmea pode direta ou indiretamente condicionar o investimento de uma outra fêmea. Esta observação pode ter implicações diretas na aquariofilia e também na conservação destas espécies.

3.5. Pai

3.5.1. Será que, no género *Nerophis*, pode existir transferência de nutrientes entre o pai e a sua prole?

A filogenia da família *Syngnathidae*, baseada em DNA mitocondrial (Wilson 2001 e 2003), surpreendentemente confirmou uma proposta prévia (Herald, 1959) baseada apenas na morfologia das estruturas reprodutivas do macho. Ambas as filogenias mostraram que as estruturas reprodutivas mais simples, como são as presentes no género *Nerophis*, estarão próximas das de um ancestral hipotético da família *Syngnathidae*. Por sua vez, estruturas mais complexas, como aquelas que são encontrados nos géneros *Syngnathus* e *Hippocampus*, serão as mais distantes do ancestral da família. Diferentes estruturas da zona incubadora têm sido correlacionadas com a diferenças no grau de proximidade entre o pai e os embriões em desenvolvimento. Nomeadamente, já foi comprovado que no género *Syngnathus* existe a transferência de recursos do pai para os descendentes (Ripley et al., 2009). Tal facto, ajudou a consensualizar o uso termo “gravidez” em *Syngnathidae*.

No género *Nerophis*, devido à maior simplicidade na estrutura e tecido de contacto com embriões em desenvolvimento, tem-se colocado a hipótese que o papel de pai durante o processo embrionário é praticamente negligenciável. Se for possível verificar uma redução de peso do pai durante a gravidez (*proxy* para o investimento paterno), então seria interessante confirmar se este investimento está relacionado com alguma variável da postura que o macho carrega. Por exemplo, haverá um investimento diferencial por parte de um macho se carregar uma postura de boa ou pior qualidade?

A análise dos nossos dados permitiu verificar que a perda de peso do pai está correlacionada com o peso da postura que carrega ($R= 0,6420$, $P<0,001$, equação: $y=0,5580x - 0,0545$) e com o peso individual dos ovos ($R= 0,561$, $P<0,005$, equação: $y=0,00146x + 0,0014$; Figura 18). Curiosamente, não se obteve uma correlação entre a perda de peso do macho e o número de ovos ($R= 0,357$, $P=0,068$, equação: $y=187,869x + 42,8149$; Figura 17). Ou seja, machos que carregam ovos mais leves (hipoteticamente de pior qualidade porque carregam menor quantidade de substâncias de reserva depositadas por via materna e necessários ao desenvolvimento embrionário) perdem mais peso do que aqueles que carregam ovos e posturas mais pesadas.

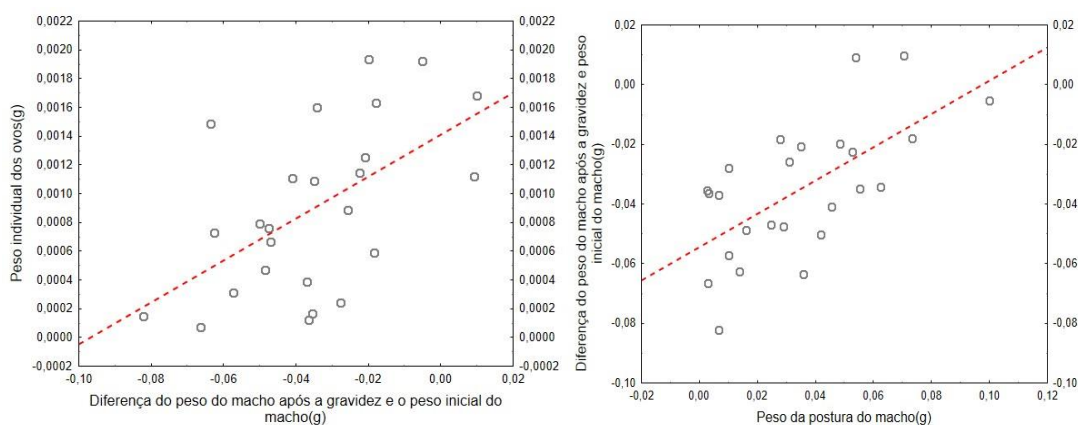


Figura 17. Relação entre a perda de peso do macho de *Nerophis lumbriciformis* e média do peso individual dos ovos e peso da prole.

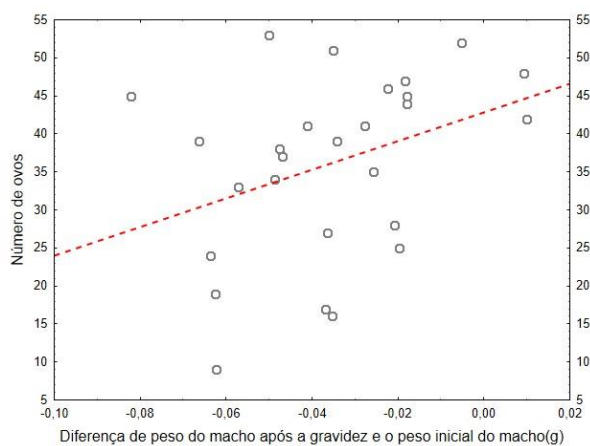


Figura 18. Relação entre a perda de peso do macho de *Nerophis lumbriciformis* e o número de ovos.

Como era esperado, também se observou que o peso ovo está positivamente correlacionado com o peso da postura do macho ($R= 0,868$, $P<0,001$, equação: $y=0,023x + 0,0001$; Figura 19).

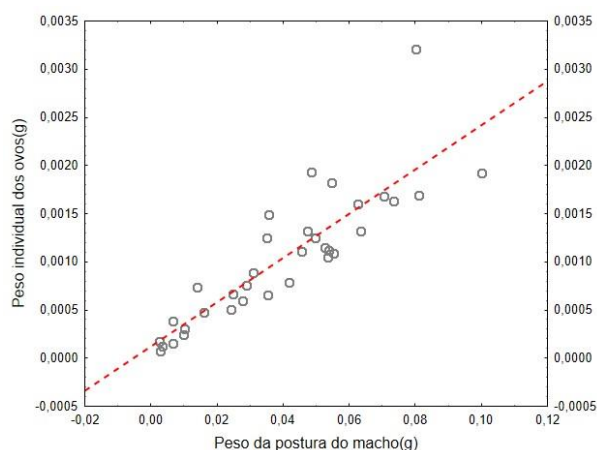


Figura 19. Relação entre o peso médio individual dos ovos e o peso da postura do macho.

Por último, também como esperado, foi encontrada uma correlação significativa entre o número de ovos e o peso da postura do macho ($R= 0,428$ e $P<0,05$, equação: $y=180,833x + 31,117$; Figura 20).

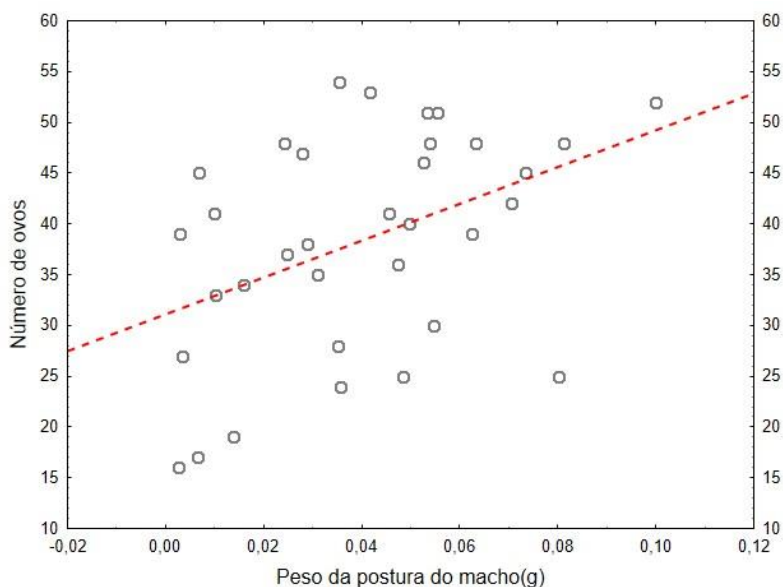


Figura 20. Relação entre o número de ovos que o macho recebeu e o peso total da postura.

Este padrão de resultados parece apontar para o facto de que, mesmo no género *Nerophis*, mais próximo do ancestral hipotético da família e onde a estrutura incubadora é relativamente simples, possa existir uma transferência de nutrientes entre o pai e a prole. Se os machos do género *Nerophis* fossem incapazes de transferir recursos para os embriões em desenvolvimento, podíamos esperar que a perda de peso por parte do

macho estivesse associada a proles maiores (mais pesadas) porque estas diminuiriam a capacidade de locomoção. No entanto, a correlação entre a perda de peso durante a gravidez e a qualidade dos ovos sugere um investimento diferencial paterno, com vista a compensar qualquer deficit existente. Se esta hipótese for, de facto, correta, justificaria o facto de observarmos, no campo, uma escolha marcada por reprodução com fêmeas grandes e coloridas, que sabemos produzirem os maiores ovos. Será energeticamente mais vantajoso para um macho reproduzir-se com uma fêmea de elevada qualidade (cujos ovos não necessitam de um investimento paterno adicional marcado), que vê simultaneamente aumentado o seu fitness uma vez que estas fêmeas são capazes de depositar posturas maiores.

3.6. Temperatura

3.6.1. O tamanho dos recém-nascidos e tempo de gravidez é influenciado pela temperatura?

Bergmann (1847) diz-nos, numa das mais conhecidas regras biogeográficas batizada com o seu nome, que as espécies endotérmicas de climas mais frios (latitudes mais altas) tendem a apresentar um tamanho corporal maior e, conseqüentemente, uma menor relação superfície-volume (crescimento lento), em comparação a espécies que habitam climas mais quentes (latitudes mais baixas). Entre os mecanismos propostos, a explicação para este padrão será a de que uma relação mais baixa entre a área da superfície e o volume corporal conservaria o corpo quente em ambientes frios e, inversamente, menor porte e uma área superficial relativamente grande, facilitaria a dispersão do calor em regiões quentes. Recentemente, Wilson (2009) observou que a lei de Bergmann atua de maneira diferente em syngnatídeos. O tamanho do corpo parece não estar correlacionado com a latitude nos cavalos marinhos monogâmicos enquanto se correlaciona em marinhas poliândricas da espécie *Syngnathus leptorhynchus*. Wilson (2009) interpretou estes resultados (aumento do tamanho do corpo com a latitude) como um mecanismo capaz de manter as potenciais taxas reprodutivas dos machos apesar das temperaturas da água do mar mais baixas (mais ovos que compensam o mais dilatado período de gestação). Assim, uma ligação entre seleção de fecundidade e lei de Bergmann foi colocada como hipótese. A regra de Bergmann também pode ser aplicada a *N. lumbriciformis*. Os indivíduos da Irlanda são maiores do que os capturados em

Portugal, onde as temperaturas da água do mar são geralmente mais elevadas (Monteiro et al., 2012). Dados ainda não publicados confirmam integralmente esta tendência, com a introdução de novas populações distribuídas pela quase totalidade da distribuição geográfica da espécie.

Ainda que longe do nosso objetivo principal, o nosso desenho experimental, com temperaturas que atingiram valores entre os 12 e 14°C, permitiu verificar que a extensão da gestação do macho está negativamente correlacionada com a temperatura a que ocorreu a gravidez ($R = -0,938$, $P < 0,05$, equação: $y = -3,667x + 88,122$; Figura 21). Quanto maior é a temperatura a que estão expostos os machos, menor é o tempo de gestação. Neste caso, foram também usados os valores apresentados para gravidezes ocorridas a temperaturas mais altas (14-15°C e 16-17°C) apresentadas no trabalho de Monteiro et al. (2005). Aqui, o desenvolvimento embrionário de *N. lumbriciformis* durou 30 dias (a 14-15°C), sendo encurtado para 25-26 dias a temperaturas mais elevadas (16-17°C).

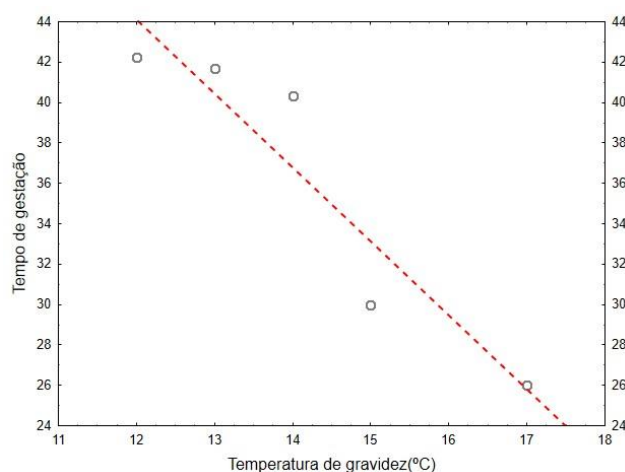


Figura 21. Relação entre o tempo de gestação dos machos e a temperatura da água a que ocorreu a gravidez.

Também se tentou verificar se o tamanho da larva estava correlacionado com a temperatura a que ocorreu a gravidez ($R = -0,896$, $P = 0,293$, equação: $y = -0,524x + 16,981$; Figura 22). Uma vez que dispúnhamos apenas de valores para três temperaturas, o valor de probabilidade e correlação encontrados entre as variáveis em estudo não deve ser interpretado como demasiado relevante. No entanto, como esperado, é possível antever um decréscimo do tamanho dos recém-nascidos à medida que a temperatura da água sobe.

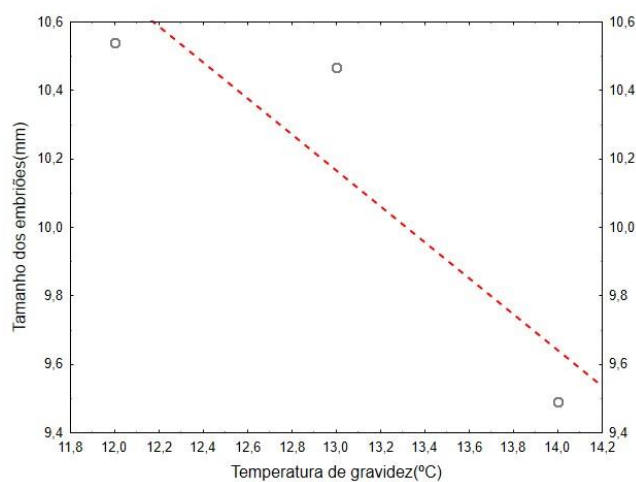


Figura 22. Relação da média dos tamanhos dos embriões com a temperatura a que ocorreu a gravidez

A temperatura é um dos mais relevantes parâmetros abióticos na biologia reprodutora de espécies ectotérmicas, pois modula decisivamente a ontogenia e determina a duração da época de reprodução. O aumento da temperatura global dos oceanos pode ter consequências dramáticas na sobrevivência das populações do *N. lumbriciformis*, reduzindo o período de reprodução junto ao limite sul de distribuição e, simultaneamente, contribuindo para alteração dos padrões normais de transporte das larvas pelágicas, devido à alteração do regime de upwelling.

4. Conclusão

No processo de seleção sexual em *N. lumbriciformis*, a competição por acasalamento é mais intensa entre fêmeas do que entre machos, beneficiando a evolução de caracteres sexuais secundários, como por exemplo a coloração, que tendem a indicar diferenças individuais de qualidade. Neste estudo, pode-se concluir que a informação dada pela coloração das fêmeas transmite uma informação confiável do potencial reprodutivo em tempo real, variando a expressão de acordo com a condição das fêmeas em dada altura. Por outro lado, também se concluiu que as fêmeas não são capazes de controlar as perdas e o impacto no fitness potencial, o que é considerado um dado interessante porque a visualização de posturas perdidas no campo é praticamente impossível. Os dados coletados sugerem que ocorre transferência de nutrientes entre o pai e a sua prole, contrariando assim a hipótese que no género *Nerophis*, por ser o mais próximo de um ancestral hipotético da família e por ter estruturas reprodutivas e tecidos de contacto menos desenvolvidas, não houvesse transferência de nutrientes para a prole. Reforçou-se ainda a noção de que a regra de Bergmann também pode ser aplicada a *N. lumbriciformis*.

Baseando-me em todos os dados verificados, penso que o resultado mais importante neste trabalho foi a observação de uma clara sincronia na coloração e peso entre pares de fêmeas, quando expostas a um macho, o que acabou por contrariar a hipótese inicial colocada que seguia uma lógica de competição entre as fêmeas pelo acesso à reprodução. Penso que seja a primeira vez que se verifica um grau marcado de sincronia em fêmeas de syngnatídeos, abrindo assim um novo campo de investigação nesta área. De salientar que a sincronia é um dado bastante importante pois pode vir a alterar várias ideias e linhas de pensamento relacionadas com a teoria da seleção sexual. Numa perspetiva futura seria relevante prosseguir a investigação de diversos aspetos da biologia desta espécie, na medida em que ainda existem lacunas que necessitam ser fundamentadas. É importante ter em consideração o estudo da temperatura pois o aumento da temperatura global dos oceanos pode ter consequências dramáticas na sobrevivência das populações do *N. lumbriciformis*, bem como na de outras espécies.

5.Referências Bibliográficas

- Adam, G. J., Rosenqvist, G., Berglund, A., Arnold, S.T. e Avise, J.C. (2000). The Bateman gradient and the cause of sexual selection in a sex-role-reversed pipefish. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences* 267: 677--680.
- Adam, G. J., Walker, D.E. e Avise, J.C. (2001). Genetic evidence for extreme polyandry and extraordinary sex-role reversal in a pipefish. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences* 268: 2531--2535.
- Ahnesjö, I. (1992a). Consequences of male brood care: weight and number of newborn in a sex-role reversed pipefish. *Functional Ecology* 6,274 -281
- Ahnesjö, I. (1992b). Fewer newborn result in superior juveniles in the paternally brooding pipefish *Syngnathus typhle* L. *Journal of Fish Biology* 41, 53--63
- Almada, V.C. e Santos, R.S. (1995). Parental care in the rocky intertidal: a case study of adaptation and exaptation in Mediterranean and Atlantic blennies. *Rev Fish Biol Fish* 5:23--37
- Almeida, A.J. (1994) Macrofauna acompanhante de zosteráceas. Importância na conservação do meio marinho. In: Professor Germano da Fonseca Sacarrão (1914--1992). Museu Nacional de História Natural, Museu Bocage, Lisbon, pp 125--144
- Almeida, O.G., Miranda, A., Frade, P., Hubbard, P.C., Barata, E.N. e Canário, A.V.M. (2005). Urine as a Social Signal in the Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Chemical Senses* 30,309-310.
- Andersson, M. (1994) *Sexual Selection*, Princeton University Press
- Anderson, M.B. e Iwasa, Y. (1996). Sexual selection. *Tree*, 11:53-58
- Andersson, M. (2004). Social polyandry, parental investment, sexual selection and evolution of reduced female gamete size. *Evolution*, 58(1), pp 24-34.
- Andersson, M. e Simmons, L. W. (2006). Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 296-302.
- Anthony, B. W., Ahnesjö, I., Vicent, A.C.J. e Meyer, A. (2003). The Dynamics of Male Brooding, Mating Patterns, and Sex Roles in Pipefishes and Seahorses (Family Syngnathidae). *Evolution* 57: 1374--1386.

- Arak, A. e Enquist, M. (1993). Hidden preferences and the evolution of signals. *Philosophical Transactions of the Royal Society London. Biological Sciences*, **340**, 207-213.
- Arnqvist, G., Edvardsson, M., Friberg, U. e T. Nilsson. (2000). Sexual conflict promotes speciation in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**: 10460-10464.
- Barata, E.N., Hubbard, P.C., Almeida, O.G., Miranda, A. e Canário, A.V.M. (2007). Male urine signals social rank in the Mozambique tilapia(*Oreochromis mossambicus*). *BMC Biology* **5**,54-64.
- Bateman, A.J. (1948) Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* **2**: 349–368.
- Berglund, A., Rosenqvist, G. e Svensson, I.(1986a). Mate choice, fecundity and sexual dimorphism in two pipefish species (*Syngnathidae*). *Behavioural Ecology and Sociobiology* **19**, 301–307.
- Berglund, A., Rosenqvist, G. e Svensson, I. (1986b). Reversed sex roles and parental energy investment in zygotes of two pipefish (*Syngnathidae*) species. *Marine Ecology Progress Series*, **29**, 209-215.
- Berglund, A., Rosenqvist, G. e Svensson, I. (1989). Reproductive success of females limited by males in two pipefish species. *American Naturalist* **133**, 506–516.
- Berglund, A. e Rosenqvist, G. (1990) Male limitation of female reproductive success in a pipefish: effects of body-size differences. *Behavioural Ecology and Sociobiology* **27**:129–133
- Berglund, A. (1991). Egg competition in a sex role reversed pipefish: Subdominant females trade reproduction for growth. *Evolution* **45**, 770-774.
- Berglund, A. e Rosenqvist, G. (1993). Selective males and ardente females in pipefishes. *Behavioural Ecology and Sociobiology* **32**, 331-336.
- Berglund, A., Bisazza, A. e Pilastro, A. (1996). Armaments and ornaments: an evolutionary explanation of traits of dual utility. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 385–399.
- Berglund, A., Rosenqvist, G. e Bernet, P. (1997). Ornamentation predicts reproductive success in female pipefish. *Behavioural Ecology and Sociobiology* **40**, 145–150.
- Berglund, A. (2000). Sex-role reversal in a pipefish: female ornaments as amplifying handicaps. *Annales Zoologici Fennici* **37**, 1–13.

- Berglund, A. e Rosenqvist, G. (2003). Sex role reversal in pipefish. *Advances in the Study of Behavior* **32**, 131–167.
- Berglung, A., Widemo, M.S. e Rosenqvist, G. (2005). Sex-role reversal revisited: choosy females and ornamented, competitive males in a pipefish. *Behavioral Ecology* **16**: 649--655.
- Berglund, A., Rosenqvist, G. e Robinson-Wolrath, S. (2006) Food or sex— males and females in a sex role reversed pipefish have different interests. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **60**, 281–287.
- Breder, R.C.M., Rosen, D.E. (1966). Modes of reproduction in fishes. Natural History Press, New York.
- Carcupino, M., Baldacci, A., Mazzini, M. e Franzoi, P. (2002). Functional significance of the male brood pouch in the reproductive strategies of pipefishes and seahorses: a morphological and ultrastructural comparative study on three anatomically different pouches. *Journal of Fish Biology*, **61**(6):1465–1480.
- Chapman, T., Arnqvist, G., Bangham, J. e Rowe, L. (2003). Sexual conflict. *Trends Ecology and Evolution*. **18**: 41-47.
- Chen, I.P., Stuart-Fox, D., Hugall, A.F. & Symonds, M.R.E. (2012). Sexual selection and the evolution of complex color patterns in dragon lizards. *Evolution* **66**: 3605–3614.
- Clutton-Brock, T. H. e Vincent, A. C. (1991). Sexual selection and the potential reproductive rates of males and females. *Nature (London)* **351**, 58–60.
- Clutton-Brock, T.H. e Parker, G.A. (1992). Potential reproductive rates and the operation of sexual selection. *The Quarterly Review of Biology*. **67**: 437-456.
- Clutton-Brock, T.H. (2007). Sexual selection in males and females. *Science* **318**: 1882-1885.
- Clutton-Brock, T.H. (2009). Sexual selection in females. *Animal Behaviour* **77**: 3-11.
- Costa, T.A.P. (2014). Plasticidade na expressão de caracteres sexuais secundários em fêmeas de uma marinha com reversão dos papéis sexuais. Departamento de Biologia, Universidade do Porto. Relatório de estágio para licenciatura.20
- Cunha, M. B., Alves, T.A. e Monteiro, M.N. (2014). Lowered pipefish filial cannibalism by reproducing males when own offspring are at risk. *Ethology*: 1-27.

- Cunha, M., Berglund, A. e Monteiro, N.M. (2015). The Intrinsically Dynamic Nature of Mating Patterns and Sexual Selection. *Environmental Biology of Fishes*. 98(4): 1047-1058 (1012) 1012.
- Cunha, M., Berglund, A., Alves, T. e Monteiro, N.M. (2016). Reduced Cannibalism During Male Pregnancy. *Journal Behaviour*. **153**(1): 91-106 (116) 116.
- Darwin, C. (1871) *The descent of man and selection in relation to sex*. Murray, London
- Dawson, C.E. (1985). *Indo-pacific pipefishes (Red sea to the Americas)*. Ocean Springs, MS: Gulf Coast Research Laboratory.
- Dawson, C.E. (1986) *Syngnatidae*: In Whitehead, P.J.P.; Bauchot, M.L.; Hureau, J.C.; Nielson, J. e Tortonese, E.(eds). *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Unesco, Paris, pp 628–639.
- Eens, M. e Pinxten, R. (200). Sex-role reversal in vertebrates: Behavioural and endocrinological accounts. *Behavioural processes* **51**, 135–147
- Emlen, S.T. e Oring, L.W. (1977). Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science* **197**, 215–223.
- Eshel, I., Volovik, I. e Sansone, E. (2000). On Fisher-Zahavi's handicapped sexy son. *Evolutionary Ecology Research*, **2**, 509-523
- Estabrook, C.B. e Estabrook, G. F. (1989) "ACTUS: a solution to the problem of analysing sparse contingency tables," *Hist Methods*, vol. 22, pp. 5–8.
- Fitzpatrick, S., Berglund, A. e Rosenqvist, G. (1995). Ornaments or offspring: costs to reproductive success restrict sexual selection processes. *Biological Journal of the Linnean Society of London*, **55**, 251–260.
- Frade, M. M. (2015). *Seleção sexual e estimativa populacional em Syngnathus typhle na Ria Formosa (Portugal)*. Faculdade de ciências e Tecnologias, Universidade do Algarve. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Marinha: 51.
- Fuller, R. e Berglund, A. (1996). Behavioral responses of a sex-role reversed pipefish to a gradient of perceived predation risk. *Behavioral Ecology* **7**: 69--75.
- Gonçalves, I.B., Ahnesjö, I. e Kvarnemo, C. (2011) The relationship between female body size and egg size in pipefishes. *J Fish Biol* **78**:1847–1854

- Gonçalves, I.B., Ahnesjö, I. e Kvarnemo, C. (2016). "Evolutionary ecology of pipefish brooding structures: Embryo survival and growth do not improve with a pouch." *Ecology and Evolution*: 1-14.
- Gonçalves-de-Freitas, E.; Castro, A.L.S.; Carvalho, T.B.; Zocoler de Mendonça, F. (2009). Sexual selection and social hierarchy in fishes. *Oecol.Bras.*, **13**: 80-88.
- Gonzalez, J.P., Costa, V., Santos, P., Slate, J., Carranza, J., Fernández-Llario, P., Zsolnai, A., Monteiro, N.M., Anton, I., Buzgó, J., Varga, G. e Beja-Pereira, A. (2014). Males and Females Contribute Unequally to Offspring Genetic Diversity in the Polygynandrous Mating System of Wild Boar. *Plos One*. e115394(12)
- Herald, E.S. (1959). From pipefish to seahorse_a study of phylogenetic relationships. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, **29**, 465-473.
- Jones, A.G. e Avise, J.C. (1997). Polygynandry in the dusky pipefish *Syngnathus floridae* revealed by microsatellite DNA markers. *Evolution* **51**:1611-1622
- Jones, T.M., Quinzel, R.J. e Balmford, A. (1998). Fisherian flies: Benefits of female choice in a lekking sandfly. *Proceedings of The Royal Society B, Biological Sciences*, **265**:1651-1657
- Jones, A.G., Rosenqvist, G., Berglund, A. e Avise, J.C. (1999). The genetic mating system of a sex-role reversed pipefish (*Syngnathus typhle*): a molecular inquiry. *Behavioural Ecology and Sociobiology*. **46**, 357–365.
- Jones, A.G. e Avise, J. C. (2001). Mating systems and sexual selection in male-pregnant pipefishes and seahorses: Insights from microsatellite-based studies of maternity. *The Journal of Heredity* 92, 150–158.
- Kirkpatrick, M. e Ryan, M.J. (1991). The evolution of mating preferences and the paradox of the lek. *Nature* **350**: 33-38.
- Kokko, H. e Monaghan, P. (2001). Predicting the direction of sexual selection. *Ecol. Lett.* **4**:159–165.
- Kokko, H. e Johnstone, R. A. (2002). Why is mutual mate choice not the norm? Operational sex ratios, sex roles and the evolution of sexually dimorphic and monomorphic signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences*, **357**:319–330.
- Kokko, H., Brooks, R., Jennions, M. e Morley, J. (2003) The evolution of mate choice and mating biases. *The Royal Society London* **270**, 653–664.

- Kokko, H., Jennions, M.D. e Brooks, R. (2006). Unifying and testing models of sexual selection. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37:43–66.
- Kokko, H. e Jennions, M.D. (2008). Parental investment, sexual selection and sex ratios. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 919–948.
- Kotiaho, J. S. e Puurtinen, M. (2007). Mate choice for indirect genetic benefits: scrutiny of the current paradigm. *Functional Ecology*, **21**, 638-644
- Kvarnemo, C. e Ingrid, A. (1996). The dynamics of operational sex ratios and competition for mates. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 404–408.
- Kvarnemo, C., Moore, G. I., Jones, A. G., Nelson, W. S. e Avise, J. C. (2000) Monogamous pair bonds and mate switching in the Western Australian seahorse *Hippocampus subelongatus*. *Journal Evolution and Biology*, **13**, 882-888.
- Kvarnemo, C. e Simmons, L. (2004). Testes investment and spawning mode in pipefishes and seahorses (*Syngnathidae*). *Biological Journal of The Linnean Society* 83: 369-376.
- Lahaye, J. (1971). L'ovogenèse chez *Nerophis lumbriciformis* (Pennant, 1776): le cycle sexuel = Oogenesis in *Nerophis lumbriciformis* (Pennant, 1776): the sexual cycle. *Cah. Biol. Mar.* **12**(2): 239-254.
- Le Vin, A. I., Adam, A., Tedder, A., Arnold, K.E. e Mable, B.K. (2011) Validation of swabs as a nondestructive and relatively non-invasive DNA sampling method in fish. *Molecular Ecology*, **11**, 107–109
- Lourie, S.A., Vincent, A.C.J. e Hall, H. J. (1999). Seahorses: na identification guide to the world's species and their conservation. Project Seahorse, London, UK.
- Lyons, D.O. e Dunne, J.J. (2003). Reproductive costs of male and female worm pipefish. *Journal of Fish Biology*, 62, 767-772.
- Lyons, D.O. e Dunne, J. J. (2004). Inter- and intra-gender analyses of feeding ecology of the worm pipefish (*Nerophis lumbriciformis*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **84**, 461–464.
- Martin-Galvez D, Peralta-Sanchez JM, Dawson DA et al. (2011) DNA sampling from eggshell swabbing is widely applicable in wild bird populations as demonstrated in 23 species. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 481–493.
- Masonjones, H. D. e Lewis, S. M. (2000). Diferences in potential reproductive rates of male and female seahorses related to courtship roles. *Animal Behaviour*. **59**, 11-20.

- McCoy, E. E., Jones, A. G. e Avise, J. C. (2001). The genetic mating system and tests for cuckoldry in a pipefish species in which males fertilize eggs and brood offspring externally. *Mol Ecol* **10**, 1793–1800.
- Mobley, K.B., Kvarnemo, C., Ahnesjö, I., Partridge, C., Berglund, A. e Jones, A.G. (2011) The effect of maternal body size on embryo survivorship in the broods of pregnant male pipefish. *Behav Ecol Sociobiol* 65:1169–1177
- Monteiro, N.M., Almada, V.C., Santos, A.M. e Vieira, M.N. (2001). The breeding ecology of the pipefish *Nerophis lumbriciformis* and its relation to latitude and water temperature. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **81**, 1031–1033.
- Monteiro, N.M., Vieira, M.N. e Almada, V.C. (2002a). Activity rhythms and cyclical changes in microhabitat preferences in the intertidal pipefish *Nerophis lumbriciformis* (Pisces: *Syngnathidae*). *Acta Ethologica* **5**, 39–43.
- Monteiro, N.M., Vieira, M.N. e Almada, V.C. (2002b) The courtship behaviour of the pipefish *Nerophis lumbriciformis*: reflections of an adaptation to intertidal life. *Acta Ethologica* **4**:109–111
- Monteiro, N.M., Almada, V.C. e Vieira, M.N. (2003). Early life history of the pipefish *Nerophis lumbriciformis* (Pisces: *Syngnathidae*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **83**, 1179–1182.
- Monteiro, N.M., Vieira, M.N. e Almada, V.C. (2005a). Homing behaviour and individual identification of the pipefish *Nerophis lumbriciformis* (Pisces; *Syngnathidae*): a true intertidal resident? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **63**, 93–99.
- Monteiro, N.M., Almada, V.C. e Vieira, M.N. (2005b) Implications of different brood pouch structures in syngnathid reproduction, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. **85** (5) 1235–1241.
- Monteiro, N.M., Almada, V.C. e Vieira, M.N. (2005c). Temporal Patterns of Breeding and Recruitment in *Nerophis lumbriciformis* (Pisces; *Syngnathidae*) Related to Seawater Temperatures. *Journal of Fish Biology*. **67**(5): 1475-1480
- Monteiro, N.M., Berglund, A., Vieira, M.N. e Almada, V.C. (2006). Reproductive migrations of the sex role reversed pipefish *Nerophis lumbriciformis* (Pisces; *Syngnathidae*). *Journal of Fish Biology*, **69**, 66–74.
- Monteiro, N.M. e Lyons, D.O. (2012). Stronger sexual selection in warmer waters: the case of a sex role reversed pipefish, *PLoS ONE* 7 (8) e44251.

- Monteiro, N.M., Vieira, N.M. e Lyons, D.O. (2013). Operational sex ratio, reproductive costs and the potential for intrasexual competition, *Biol. J. Linnean Soc.* **110** 477–484.
- Monteiro, N.M., Silva, R.M., Cunha, M., Antunes, A., Jones, A.G. e Vieira, M.N. (2014). Validating the use of Colouration Patterns for Individual Recognition in the Worm Pipefish Using a Novel Set of Microsatellite Markers. *Molecular Ecology Resources.* **14**(1): 150-156.
- Prum, R.O. (2012). Aesthetic evolution by mate choice: Darwin's really dangerous idea. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **367**, 2253-2265
- Prunier J, Kaufmann B, Grolet, O., Picard, D., Pompanon, F. e Joly, P. (2012) Skin swabbing as a new eficiente DNA sampling technique in amphibians, and 14 new microsatellite markers in the alpine newt (*Ichthyosaura alpestris*). *Molecular Ecology Resources*, **12**, 524–531.
- Ré, P. (1999). Ictioplâncton estuarino da Península Ibérica (Guia de identificação dos ovos e estados larvares planctónicos), 163pp, 51 Figura Prémio do Mar, 1996. Câmara Municipal de Cascais. ISBN 972-637-065-5.
- Ripley J.L. e Foran C.M. (2006). Population structure, growth rates, and seasonal abundance of two *Syngnathus* pipefish species. *Estuaries and Coasts*, **29**, 1161–1171.
- Ripley, J.L. e Foran, C.M. (2009). Direct evidence for embryonic uptake of paternally derived nutrients in two pipefishes (*Syngnathidae*: *Syngnathus* spp.). *Journal of Comparative Physiology B* **179**:325-333.
- Rosenqvist, G. e Berglund, A. (2011). Sexual signals and mating patterns in *Syngnathidae*. *Journal of Fish Biology*, **78**, 1647–1661.
- Russell, F.S. (1976). The eggs and planktonic stages of British marine fishes. Academic Press, London: 524pp.
- Ryan, M.J. (1998). Receiver biases, sexual selection and the evolution of sex differences. *Science*, **281**, 1999–2003
- Ryer, C.H. (1988). Pipefish foraging: effects of fish size, prey size and altered habitat complexity. *Marine Ecology Progress Series*, **48**, 37-45.
- Sagebakken, G., Ahnesjö, I., Mobley, K.B., Gonçalves, I.B. e Kvarnemo, C. (2009). Brooding fathers, not siblings, take up nutrients from embryos. — *Proc. Roy. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* **277**: 971-977.

- Sandvik, M., Rosenqvist, G. e Berglund, A. (2000). Male and female mate choice affects offspring quality in a sex-role-reversed pipefish. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences* 267: 2151--2155.
- Sárria, M.P., Santos, M.M., Castro, L.F.C., Vieira, N.M. e Monteiro, N.M. (2013). Estrogenic Chemical Effects Are Independent from the Degree of Sex Role Reversal in Pipefish. *Journal of Hazardous Materials.*" 263: 746-753 (748) 748.
- Silva, K., Almada, V.C., Vieira, M.N. e Monteiro, N.M. (2009). Female reproductive tactics in a sex-role reversed pipefish: screening for quality and number, *Behav. Ecol.* **20** (4) 768–772.
- Silva, K., Vieira, M.N., Almada, V.C. e Monteiro, N.M. (2010). Reversing sex-role reversal: compete only when you must, *Anim. Behav.* **79** (4) 885–893.
- Silva, M.C.F. (2012). Alocação de recursos para a reprodução em *Syngnathidae*. Departamento de Biologia, Universidade do Porto. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia e Gestão da Qualidade da Água: 70.
- Stölting, K.N. e Wilson, A.B. (2007) Male pregnancy in seahorses and pipefish: beyond the mammalian model. *BioEssays*, **29**(9):884–896.
- Svensson, I. (1988). Reproductive costs in two sex-role reversed pipefish species (*Syngnathidae*). *Journal of Animal Ecology*, **57**, 929-942.
- Trivers, R.L. (1972). Parental investment and sexual selection. In: Campbell, B. (Ed.), *sexual selection and the descent of man*, Aldine, Chicago, pp. 136–179.
- Vincent, A.C.J., Ahnesjö, I., Berglund, A. e Rosenqvist, G. (1992). Pipefishes and seahorses: are they all sex role reversed? *Trends in Ecology and Evolution*, **7**, 237-241.
- Vincent, A.C.J. (1994). Seahorses exhibit conventional sex roles in mating competition, despite male pregnancy. *Behaviour* **128**, 135–151.
- Vincent, A.C.J. e Sadler, L.M. (1995). Faithful pair bonds in wild seahorses, *Hippocampus whitei*. *Animal Behaviour* **50**, 1557-1569
- Wheeler, A.C. (1969). *The Fishes of the British Isles and North-west Europe*. Michigan State University Press.
- Williams, G. (1975). *Sex and evolution*. Princeton (NJ): Princeton University Press.
- Wilson, A.B., Vincent, A.C.J., Ahnesjö, I. e Meyer, A. (2001). Male pregnancy in seahorses and pipefishes (Family *Syngnathidae*): rapid diversification of paternal brood

pouch morphology inferred from a molecular phylogeny. *Journal of Heredity*, **92**, 159-166.

Wilson, A. B., Ahnesjö, I., Vincent, A. C. J. e Meyer, A. (2003). The dynamics of male brooding, mating patterns, and sex roles in pipefishes and seahorses (Family *Syngnathidae*). *Evolution* **57**, 1374–1386.

Wilson, A.B. e Orr, J.W. (2011). The evolutionary origins of *Syngnathidae*: pipefishes and seahorses. *Journal of Fish Biology* **78**: 1603–1623

Zahavi, A. (1975). Mate selection – a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* **53**, 205-214.

Zeh, J.A. e Zeh, D.W. (1996). The evolution of polyandry. I. Intra-genimic conflict and genetic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences*. **263**, 1711-1717